

**T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**PRİMER VE SEKONDER İMMÜN YETMEZLİKLİ HASTALARDA  
SAPTANAN SİTOMEGALOVİRÜS SUŞLARINDA GANSİKLOVİR  
DİRENCİNİN GENOTİPİK YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

**Dr. Aytakin FIRTINA**

**UZMANLIK TEZİ  
Olarak Hazırlanmıştır**

**ANKARA**

**2023**



**T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**PRİMER VE SEKONDER İMMÜN YETMEZLİKLİ HASTALARDA  
SAPTANAN SİTOMEGALOVİRÜS SUŞLARINDA GANSİKLOVİR  
DİRENCİNİN GENOTİPİK YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

**Dr. Aytakin FIRTINA**

**UZMANLIK TEZİ  
Olarak Hazırlanmıştır**

**TEZ DANIŞMANI  
Prof. Dr. Ahmet PINAR**

**ANKARA**

**2023**

## TEŞEKKÜR

Bir tez çalışmasından öte, geleceğe hizmet etmek amacıyla başladığım bu çalışmamın amacına ulaşmış olmasının verdiği huzur ve mutluluk içerisindeyim. Aynı zamanda çıktığım bu yolda eksiklerimi tamamlayarak daha ileriye gidebilmenin amatör heyecanını yaşamaktayım.

Tüm bu süreç boyunca birlikte çalışmaktan onur duyduğum ve kendimi şanslı hissettiğim, kendisinde akademik danışmandan daha fazlasını bulduğum, bilgisini, tecrübesini bütün samimiyetiyle aktaran ve kendisinden akademisyen bir baba olmayı öğrendiğim çok değerli hocam Prof. Dr. Ahmet Pınar'a,

Varlığını sürekli yanımda hissettiğim Prof. Dr. Koray Ergünay'a, her zaman sorularıma sabırla yanıt veren ve değerli zamanını esirgemeyerek bana birikimlerini aktaran Dr. Öğr. Üyesi Ceylan Polat'a,

Uzmanlık eğitimim süresince engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım Hacettepe Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nın tüm öğretim üyelerine,

Birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum Dr. Adem Özdemir ve Dr. Ekin Kırbaş başta olmak üzere tüm uzmanlık eğitimi arkadaşlarıma,

Çalışmam boyunca benden yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Alpaslan Alp ve Merkez Moleküler Laboratuvar ekibine ve yaptığım tüm deneylerde her zaman elimi tutan ve kendisini ağabeyim olarak bildiğim emekli Lab. Tek. Ali İrfan Atmaca'ya ve tezimin sonuçlarının istatistiksel analizinde yardım eden Uzm. Dr. Gizem Karahan ve Uzm. Dr. İrfan Karahan'a,

Her an hayat kaynağım olan biricik eşim Seda Fırtına'ya, kıymetli evlatlarım Furkan'a ve Buğra'ya, hayatıma düşünceleriyle vizyon katan saygı değer babam Duran Fırtına ve annem Şerife Fırtına'ya

THD-2022-20069 numaralı bu projeye destek veren Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Koordinasyon Birimine sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

## ÖZET

**Fırtına A, Primer ve sekonder immün yetmezlikli hastalarda saptanan sitomegalovirüs suşlarında gansiklovir direncinin genotipik yöntemlerle araştırılması, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Ankara, 2023.** İmmün yetmezliği olan hasta grupları modern tıbbın ilerlemesiyle birlikte artmaktadır. Sitomegalovirüs (CMV), özellikle nakil hastaları ve insan immün yetmezlik virüsü (HIV) ile yaşayan bireyler gibi immün yetmezliği olan hasta gruplarında fırsatçı patojen olarak ciddi hastalık ve ölümlere sebep olmaktadır. Bazen, bu enfeksiyonlar ilk tedavi seçeneği olan gansiklovire klinik olarak yanıt vermemektedir. Sonuçta uzamış tedavi ve hastaneye yatış süresi, yan etkileri daha fazla olan medikal tedavi değişiklikleri, kalıcı organ hasarları ve ölüme kadar gidebilen süreçler yaşanabilmektedir. Tüm bunlar göz önüne alındığında tedavi sürecinde antiviral direnç testlerinin önemi daha da artmaktadır. Bu çalışmada, Hacettepe hastanelerine başvuran primer ve sekonder immün yetmezliği olan hastalarda görülen CMV enfeksiyonları ve bu enfeksiyona sebep olan CMV suşlarında gansiklovire karşı direnç varlığının genotipik yöntemlerle araştırılması amaçlanmıştır. CMV organ tutulumu olan hastalarda, olmayanlara oranla daha fazla antiviral direnç görülmesi öngörülmüştür. Bir yıl boyunca çalışmaya dahil edilen hasta plazmaları ileriye dönük olarak toplanmıştır. Toplamda 142 hastaya ait plazma örneklerinden CMV DNA izolasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Primer tasarlanması ve nested-PZR optimizasyonu yapıldıktan sonra tüm DNA izolatları bu PZR deneyine dahil edilmiştir. Deneyler sonucunda 77 hastada hedeflenen bölgede ampikon saptanmıştır. Elde edilen ampikonlar Sanger DNA dizileme yöntemi ile dizilenmiş ve sonuçta 77 hasta için veri elde edilmiştir. Elde edilen diziler kullanıma açık olan bir direnç ilişkili mutasyon saptayan platform üzerinden yorumlanmıştır. Sonuçta 77 hastadan ikisinde gansiklovir direnciyle ilişkili M460V ve A594V mutasyonları saptanmıştır. İki hastada genetik polimorfizmle ilişkili olan D605E mutasyonu bulunmuştur. Ayrıca gansiklovir direncine olan etkisi bilinmeyen V542I mutasyonu üç hastada, A435V ve A427T mutasyonlarının varlığı ise iki ayrı

hastada gösterilmiştir. Hematopoetik kök hücre nakli (HKHN) alıcısı olan 32 hastanın üçüne olası akciğer tutulumu ve bir hastaya CMV pnömonisi tanısı koyulmuştur. Yine bu grupta iki hastada gastrointestinal sistem (GİS) tutulumu ve dört hastada retinit görülmüştür. Bir HIV hastasında görülen akciğer tutulumu hariç tüm organ tutulumları HKHN alıcılarında görülmüştür. Ayrıca çalışmamıza yedi solid organ nakli (SOT), üç HIV enfeksiyonu, iki konjenital CMV enfeksiyonu ve diğer hastalıklara bağlı immün yetmezliği olan 33 hasta katılmıştır. Direnç ilişkili M460V mutasyonu CMV retiniti olan hastada, A594V mutasyonu ise CMV pnömoni tanısı alan hastada saptanmıştır. Sonuç olarak; CMV organ tutulumu olan ve olmayan hasta grupları arasında gansiklovir direnci açısından anlamlı fark saptanmamıştır ( $p=0,610$ ). Hasta gruplarındaki katılımcı sayısının artırılıp, her bir hasta grubunun tek başına değerlendirildiği çalışmalara ihtiyaç olduğu kanısına varılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** CMV antiviral duyarlılık; genotipik antiviral duyarlılık testleri; antiviral direnç; Sanger dizileme yöntemi; immün yetmezlik

**Destekleyen kuruluş:** Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Koordinasyon Birimi, Proje no: THD-2022-20069

## ABSTRACT

**Firtina A, Investigation of ganciclovir resistance in cytomegalovirus strains isolated from patients with primary and secondary immunodeficiency by genotypic methods, Hacettepe University, Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Thesis In Medical Microbiology, Ankara, 2023.** Patient groups with immunodeficiency are increasing with the advancement of modern medicine. CMV causes serious illness and death as an opportunistic pathogen, especially in immunocompromised patient groups such as transplant patients and individuals living with HIV. Sometimes, these infections do not respond clinically to ganciclovir, the first-line treatment option. As a result, prolonged treatment and hospitalization time, medical treatment changes with more side effects, permanent organ damage and processes that can lead to death may occur. Considering all these, the importance of antiviral resistance tests in the treatment process increases even more. In this study, it was aimed to investigate CMV infections in patients with primary and secondary immunodeficiency admitted to Hacettepe hospitals and the presence of resistance to ganciclovir in CMV strains causing this infection by genotypic methods. It has been hypothesized that patients with CMV organ involvement have more antiviral resistance than those without. Plasma from patients included in the study for one year were prospectively collected. CMV DNA isolation was performed from plasma samples of 142 patients in total. After primer design and nested-PCR optimization, all DNA isolates were included in this PCR experiment. As a result of the experiments, bands were detected in the targeted region in 77 patients. Band-detected sequences were sequenced by the Sanger DNA sequencing method, resulting in data for 77 patients. The resulting sequences were interpreted on a readily available resistance-associated mutation detection platform. As a result, M460V and A594V mutations associated with ganciclovir resistance were detected in two of 77 patients. D605E mutation associated with genetic polymorphism was found in two patients. In addition, the V542I mutation with unknown effect on ganciclovir resistance was shown in three patients, and the presence of A435V and A427T mutations in two separate patients. Thirty two patients were hematopoietic stem cell transplant (HSCT) recipients, and three patients had possible lung involvement and

one patient had CMV pneumonia. The patient diagnosed with CMV pneumonia was the patient with the A594V mutation. In this group, GIS involvement was observed in two patients and retinitis was observed in four patients. The M460V mutation was observed in the patient who was treated with the diagnosis of CMV retinitis. Except for the lung involvement seen in one HIV patient, all organ involvements were seen in HSCT recipients. In addition, seven solid organ transplant (SOT), three HIV infection, two congenital CMV infection and 33 patients with immunodeficiency due to other diseases participated in our study. Possible CNS involvement was observed in one of the patients with congenital CMV infection. In conclusion, no significant difference was found between the patient groups with and without CMV organ involvement in terms of ganciclovir resistance. It was concluded that there is a need for studies that increase the number of participants in patient groups and evaluate each patient group individually.

**Keywords:** CMV antiviral susceptibility; genotypic antiviral susceptibility tests; antiviral resistance; Sanger sequencing method; immunodeficiency

**Supporting organization:** Hacettepe University Scientific Research Coordination Unit, Project no: THD-2022-20069



## İÇİNDEKİLER

<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>iii</b>
<b>ÖZET</b> .....	<b>iv</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>vi</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>viii</b>
<b>SİMGELER ve KISALTMALAR</b> .....	<b>x</b>
<b>ŞEKİLER</b> .....	<b>xiii</b>
<b>TABLolar</b> .....	<b>xiv</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	<b>3</b>
2.1. Sitomegalovirüs.....	3
2.1.1 Tarihçe.....	3
2.1.2 Virüsün Genel Özellikleri .....	5
2.1.3 CMV replikasyon döngüsü .....	8
2.1.4 Epidemiyoloji ve Bulaş.....	10
2.1.5 Patogenez ve İmmünite .....	12
2.2. Sitomegalovirüs Hastalıkları ve Klinik Bulgular .....	14
2.3. Sitomegalovirüsün Laboratuvar Tanısı.....	19
2.3.1. Hücre Kültürü.....	19
2.3.2. Histopatolojik İnceleme .....	20
2.3.3. Antijenemi Testi (pp65 Testi).....	20
2.3.4. Moleküler Testler .....	21
2.3.5. Serolojik Testler .....	23
2.4. Sitomegalovirüs Enfeksiyonlarının Tedavisi.....	25
2.4.1. CMV DNA Polimeraz İnhibitörleri.....	25
2.5. CMV’de Antiviral İlaç Direnci.....	31
2.5.1 Antiviral İlaç Direnç Testlerinin Önemi.....	31
2.5.2 Antiviral İlaç Direnç Tespitinde Kullanılan Fenotipik Yöntemler.....	32
2.5.3 Antiviral İlaç Direnç Tespitinde Kullanılan Genotipik Yöntemler .....	34
2.5.4 Antiviral İlaç Testlerin Yorumlanması .....	38
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM</b> .....	<b>44</b>
3.1. Hastaların Seçimi .....	44

3.2.	Plazmadan Viral DNA İzolasyonu .....	45
3.3.	Primerlerin Tasarlanması .....	46
3.4.	PZR Optimizasyonu .....	48
3.5.	PZR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezinde Görüntülenmesi .....	50
3.6.	PZR Ürünlerinin Dizi Analizlerinin Yapılması .....	51
3.7.	DNA Dizi Verilerinin Analizi .....	52
3.8.	Mutasyon Analizi .....	53
3.9.	İstatiksel Analiz .....	53
<b>4.</b>	<b>BULGULAR.....</b>	<b>54</b>
4.1.	Hastaların Genel Özellikleri .....	54
4.1.1.	HKHN Hastalarının Özellikleri.....	57
4.1.2.	SOT Hastalarının Özellikleri.....	58
4.1.3.	HIV ile Yaşayan Bireylerin Özellikleri .....	58
4.1.4.	Konjenital CMV Enfeksiyonu Bulunan Hastaların Özellikleri .....	58
4.2.	Plazmadan Viral DNA İzolasyonu ve PZR Bulguları .....	58
4.3.	DNA Dizi Analizi Bulguları .....	59
<b>5.</b>	<b>TARTIŞMA .....</b>	<b>67</b>
<b>6.</b>	<b>SONUÇ ve ÖNERİLER .....</b>	<b>81</b>
<b>7.</b>	<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>83</b>
<b>8.</b>	<b>EKLER .....</b>	<b>94</b>

## SİMGELER ve KISALTMALAR

<b>%</b>	Yüzde
<b>°C</b>	Santigrat derece
<b>ABD</b>	Amerika Birleşik Devletleri
<b>AIDS</b>	Edinilmiş Bağışıklık Eksikliği Sendromu
<b>ATP</b>	Adenozine trifosfat
<b>BAL</b>	Bronkoalveolar Lavaj
<b>BLAST</b>	Temel Yerel Uyum Arama Aracı
<b>BOS</b>	Beyin omurilik sıvısı
<b>cCMV</b>	Konjenital CMV enfeksiyonu
<b>CDV</b>	Sidofovir
<b>CID</b>	Jeneralize sitomegalik inklüzyon hastalığı
<b>CMV</b>	Sitomegalovirüs
<b>CTL</b>	Sitotoksik T lenfositler
<b>CVID</b>	Yaygın değişken immün yetmezlik
<b>ddNTPs</b>	Dideoksinükleik asitler
<b>dk</b>	Dakika
<b>DNA</b>	Deoksiribonükleik asit
<b>dNTPs</b>	Deoksinükleik asitler
<b>DSÖ</b>	Dünya Sağlık Örgütü
<b>EBV</b>	Epstein-Barr virüs
<b>EC50</b>	Etkili konsantrasyon 50
<b>EDTA</b>	Etilen diamin tetra asetik asit
<b>EIA</b>	Enzim immünoassay
<b>FDA</b>	Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi
<b>FOS</b>	Foskarnet
<b>gB</b>	Glikoprotein B

<b>GCV</b>	Gansiklovir
<b>gH</b>	Glikoprotein H
<b>GiS</b>	Gastrointestinal sistem
<b>gr</b>	Gram
<b>GVHD</b>	Graft versus host hastalığı
<b>HAART</b>	Yüksek Aktiviteli Antiretroviral Tedavi
<b>HHV-5</b>	İnsan Herpesvirüs 5
<b>HHV-6</b>	İnsan Herpesvirüs 6
<b>HIV</b>	İnsan immün yetmezlik virüsü
<b>HKHN</b>	Hematopoetik kök hücre nakli
<b>HSV-1</b>	Herpes simplex virüs tip 1
<b>HSV-2</b>	Herpes simplex virüs tip 2
<b>ICP-4</b>	Enfekte hücre proteini-4
<b>ICTV</b>	Uluslararası Virüsler Taksonomisi Komitesi
<b>Ig</b>	İmmün globülin
<b>IgG</b>	İmmün globülin G
<b>IgM</b>	İmmün globülin M
<b>IHA</b>	İndirekt hemaglutinasyon antikor
<b>IL-10</b>	İnterlökin-10
<b>IU</b>	Uluslararası ünite
<b>IV</b>	Damar içi
<b>IVIG</b>	Damar içi insan antikor
<b>KCFT</b>	Karaciğer fonksiyon testleri
<b>KF</b>	Kompleman fiksasyon
<b>kPZR</b>	Kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu
<b>LMV</b>	Letermovir
<b>MBV</b>	Maribavir
<b>mCP</b>	Minör kapsid proteini
<b>MCP</b>	Major kapsid proteini
<b>mL</b>	Mililitre
<b>mM</b>	Milimolar
<b>MRA</b>	Mutasyon direnç analiz platformu

<b>mRNA</b>	Mesajcı ribonükleik asit
<b>NAAT</b>	Nükleik asit amplifikasyon testi
<b>NCBI</b>	Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi
<b>NHL</b>	Non-Hodgkin lenfoma
<b>NT</b>	Nötralizasyon testi
<b>PDGF</b>	Platelet kaynaklı büyüme faktörü
<b>Pfu</b>	Plak oluşturan birim
<b>PMNL</b>	Polimorfonükleer lökosit
<b>PRA</b>	Plak redüksiyon testi
<b>PZR</b>	Polimeraz zincir reaksiyonu
<b>RFLP</b>	Restriksiyon fragman uzunluğu polimorfizmi
<b>RNA</b>	Ribonükleik asit
<b>Rpm</b>	Dakikadaki dönme sayısı
<b>sn</b>	Saniye
<b>SNİK</b>	Sensörinöral işitme kaybı
<b>SOT</b>	Solid organ transplantasyonu
<b>SSS</b>	Santral sinir sistemi
<b>TBE</b>	Tris-borik asit-EDTA
<b>UL</b>	'Unique long'
<b>US</b>	'Unique short'
<b>VZV</b>	Varisella zoster virüs
<b>µL</b>	Mikrolitre
<b>µM</b>	Mikromolar

## ŞEKİLER

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. İnsan CMV virion yapısı .....	5
Şekil 2.2. CMV genom organizasyonu .....	6
Şekil 2.3. CMV replikasyon döngüsü .....	10
Şekil 2.4. İmmün sistemi normal olan konakta CMV'ye karşı doğal ve kazanılmış bağışıklık yanıt .....	13
Şekil 2.5. Radyoaktif işaretli ddNTP'ler kullanılarak yapılan klasik Sanger dizileme görüntüsü.....	36
Şekil 2.6. Floresan boyalar ve kapiller elektroforezin kullanıldığı otomatik Sanger dizileme yöntemi.....	37
Şekil 2.7. <i>UL97</i> geninin kinaz alt bölgesinin haritası.. .....	40
Şekil 2.8. CMV DNA polimeraz ( <i>UL54</i> ) geninin haritalanması .....	42
Şekil 3.1. Referans dizi, anlamlı dizi, tamamlayıcı dizi ve elde edilen uzlaşma dizilerinin değerlendirildiği bir hasta örneği.....	52
Şekil 4.1. Beş hasta üzerinde yapılan PZR sonucunun görüntülenmesi.....	59
Şekil 4.2. On iki numaralı hastaya ait dizi verisi .....	61
Şekil 4.3. On iki numaralı hastaya ait MRA platformu üzerinden alınan mutasyon analiz sonucu.....	61
Şekil 4.4. Otuz yedi numaralı hastaya ait dizi verisi .....	62
Şekil 4.5. Otuz yedi numaralı hastaya ait MRA platformu üzerinden alınan mutasyon analiz sonucu.....	63
Şekil 4.6. Genetik polimorfizmle ilişkili mutasyon saptanan hastaya ait MRA platformu üzerinden alınan analiz sonucu.....	66

## TABLOLAR

<b>Tablo</b>	<b>Sayfa</b>
<b>Tablo 2.1.</b> Transplant alıcılarında CMV hastalık tanımları .....	17
<b>Tablo 2.2.</b> <i>UL97</i> genotipleri ile ilişkili gansiklovir direnci düzeyleri. ....	41
<b>Tablo 3.1.</b> İç primer dizileri ve özellikleri .....	47
<b>Tablo 3.2.</b> Dış primer dizileri ve özellikleri.....	47
<b>Tablo 3.3.</b> Birinci tur PZR karışım içeriği ve son konsantrasyonlar .....	49
<b>Tablo 3.4.</b> İkinci tur PZR karışım içeriği ve son konsantrasyonlar .....	49
<b>Tablo 3.5.</b> PZR 1sı döngü protokolü .....	50
<b>Tablo 4.1.</b> Hastaların tedavi edilen bölümlere göre dağılımı ve yüzde oranları.....	54
<b>Tablo 4.2.</b> CMV organ tutulumlarının sıklık ve yüzde dağılımı.....	55
<b>Tablo 4.3.</b> Olası CMV organ tutulumlarının sıklık ve yüzde dağılımları .....	55
<b>Tablo 4.4.</b> Hastaların immün yetmezlik sebebine göre sıklık ve yüzdeleri.....	56
<b>Tablo 4.5.</b> Hasta gruplarında direnç analizi yapılan kişi sayısı ve direnç dağılımı ...	57
<b>Tablo 4.6.</b> Direnç ilişkili mutasyon saptanan hastalara ait diğer laboratuvar ve klinik özellikler.....	63
<b>Tablo 4.7.</b> Direnç ilişkisi bilinmeyen mutasyonların saptandığı hastaların özellikleri .....	65

## 1. GİRİŞ

İnsan sitomegalovirüs (CMV), latent enfeksiyonlara neden olma yetenekleri ile tanınan *Herpesviridae* ailesinin, *Betaherpesvirinae* alt ailesinin bir üyesidir. CMV prevalansı toplumlar arasında değişmekle birlikte, gelişmekte olan ülkelerde bu oran %90'ın üzerindedir. Ülkemizde seropozitiflik oranı, %85-%100 arasında bildirilmektedir (1, 2). CMV, damlacık, cinsel temas, kan transfüzyonları, solid organ ve kemik iliği transplantasyonları ve plasenta yoluyla bulaşarak enfeksiyonlara sebep olmaktadır (1, 3).

CMV enfeksiyonları, primer enfeksiyon ve sekonder (tekrarlayan) enfeksiyonlar şeklinde gelişebilmektedir. Primer enfeksiyon daha önce CMV ile karşılaşmamış konağa virus bulaşı ile ortaya çıkar. Bağışıklık sistemi sağlam hastalarda belirtisiz ya da kendini sınırlayan, heterofil antikor testinin negatif olduğu enfeksiyöz mononükleoz benzeri tabloyla seyrederek hayat boyu latent enfeksiyona sebep olur (4). Ancak, primer ve kazanılmış immün yetmezlikli hastalarda ve konjenital CMV hastalarında ciddi mortalite ve morbiditeye sebep olmaktadır. Sekonder enfeksiyonlar ise latent enfeksiyonların reaktivasyonu ya da seropozitif hastalarda reenfeksiyon şeklinde olmaktadır (2).

Bağışıklık sistemi baskılanmış konakta CMV enfeksiyonu tanı ve tedavisi morbidite ve mortalitenin önlenmesi açısından önem taşımaktadır. Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından CMV hastalığının önlenmesinde ve/veya tedavisinde kullanım onayı alan ajanlar gansiklovir, valgansiklovir, foskarnet ve sidofovirdir (4). Bir guanozin analogu olan gansiklovir, CMV tedavisinde onay alan ilk antiviral ilaçtır. Gansiklovir hücreye girdikten sonra *UL97* geni tarafından kodlanan viral protein kinazlar tarafından gansiklovir monofosfata çevrilir. Daha sonra hücresel kinazlar tarafından gansiklovir trifosfat şeklinde aktif molekül haline getirilir. Aktif haldeki gansiklovir trifosfat, viral *UL54* gen bölgesinden kodlanan DNA polimeraz enzimini inhibe ederek etkisini gösterir. Valgansiklovir, gansiklovirin L-valil ester formu olup oral yoldan kullanılır. Oral kullanım sonrası bağırsak ve karaciğer hücrelerinin ürettiği esterazlar tarafından yıkılarak gansiklovire dönüşür.



Valgansiklovirin bu dönüşümü sonrası hücre içi aktifleşme ve antiviral etki mekanizması gansiklovirle tamamen aynıdır (4, 5).

Konak hücre içerisinde viral DNA replikasyonu aşamasında *UL97* ve *UL54* gen bölgelerinde meydana gelen mutasyonlar gansiklovir ve valgansiklovire karşı çeşitli düzeylerde dirençten sorumludur. Yapılan çalışmalarda gansiklovir direncinin %95 oranında *UL97* gen bölgesindeki mutasyonlardan kaynaklandığı gösterilmiştir (6).

Antiviral direnç tespitinde fenotipik ve genotipik yöntemler uygulanmaktadır. Fenotipik testler daha çok, genotipik testlerde saptanan varyantların viral dirence olan etkisini in-vitro tespit etmek için tercih edilmektedir. Hastalardan saptanan suşların antiviral direnç tespitinde ise genotipik testler daha yaygın kullanılmaktadır. Bu testlerle dirençle ilişkili olduğu bilinen genler üzerindeki mutasyonlar saptanmakta ve sokak suşları ile karşılaştırılmaktadır. Genotipik testlerin bir başka faydası ise yeni ortaya çıkan mutasyonları saptayabilmesidir. Bu viral genetik değişikliklerin sürekli takibi CMV profilaksi ve tedavisinde kliniğe yol gösterici olmaktadır. Genotipik testlerin en önemli kısıtlılıkları ise ilaç direncine sebep olan mutasyonların önceden tespit edilmiş olma gerekliliğidir (4).

Literatürde CMV enfeksiyonları ve gansiklovir direnci üzerine yapılan çalışmaların sonucunda, tanı ve tedavide kullanılan rehberler oluşturulmuştur (7, 8). Bu rehberler ışığında, gansiklovir tedavisine karşı virolojik direnç saptanan hastalarda prognozun daha kötü olduğu bilinmektedir (6).CMV enfeksiyonunda ve hastalığında virolojik direncin önemi hem klinik uygulama açısından hem de laboratuvar uygulaması açısından merak konusudur. Bu çalışmanın hipotezi de CMV hastalığı olan kişilerde, virolojik direncin ön planda olduğu varsayımı üzerine kurulmuştur. Bu çalışmada, Hacettepe Üniversitesi Hastaneleri'ne başvuran primer ve sekonder immün yetmezlikli hastalardan izole edilen CMV izolatlarında gansiklovir direncinin genotipik yöntemlerle araştırılması ve CMV enfeksiyonu ile CMV hastalığı arasında virolojik direnç farkının ortaya konması amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Sitomegalovirüs

#### 2.1.1 Tarihçe

CMV ile ilgili ilk bulgular, 1900'lü yılların başlarında tanımlanmıştır. Ribbert 1881 yılında ölü doğan bir bebeğin böbrek kesitlerinde dev hücreler saptamıştır (9). Løwenstein 1907 yılında, çekirdekleri kenarda yerleşmiş ve çekirdek içi inklüzyon cisimcikleri olan dev hücreler tanımlamıştır (10). Bu tipik görüntü çekirdek içerisinde inklüzyon cisimcikleri içeren sitomegalik hücre patolojisinin ilk örneği kabul edilmiştir. İlk kez 1932'de peteşi, hepatosplenomegali ve intraserebral kalsifikasyonlarla karakterize 25 mortal konjenital enfeksiyon vakası tanımlanmıştır. Bu bireylerin tamamında çekirdek içi inklüzyon cisimciği içeren hücreler saptanmıştır. Wyatt ve ark. bu tabloya, etiyojisi henüz bilinmemekle birlikte "jeneralize sitomegalik inklüzyon hastalığı (CID)" adını vermişlerdir (11). Minder 1953 yılında ilk kez bir CID vakasının pankreatik hücrelerinde, çekirdek içi cisimciklerin etrafındaki berrak halede virüsü düşündüren 199 nm büyüklüğündeki partikülleri elektron mikroskobu ile göstermiştir (12).

İnsanlardan CMV izolasyonu, laboratuvar ortamında hücre kültürlerinde insan hücrelerinin kullanımına girmesiyle mümkün olmuştur. Amerikan pediatrist ve virolog olan Thomas H. Weller 1957 yılında ilk kez insanlardan CMV izole etmiş ve bu virüsü daha sonra 'sitomegalovirüs' olarak adlandırmıştır (13, 14).

CMV'nin izolasyonu ile birlikte toplumlardaki epidemiyolojisi için çalışmalar da başlamıştır. Rowe ve ark. CMV antijenlerini kullanarak yaptıkları çalışmada Washington'da seropozitiflik oranını %81 olarak saptamışlardır (15). Sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda da benzer sonuçlar bulunmuştur (16). Toplumlar arası çalışmalarda ise sosyoekonomik seviye azaldıkça seropozitiflik oranının arttığı gözlemlenmiştir (17).

CMV'ye özgül testlerin kullanımının artması, klinik pratikte yeni tanıları beraberinde getirmiştir. Klemola ve ark. enfeksiyöz mononükleoz tablosu olan genç erişkinlerde farklı bir alt formun olduğunun farkına varmışlardır (18). Epstein-Barr

virüsüne (EBV) yönelik heterofil antikor testinin negatif olması ve CMV'ye özgül serolojik testlerin pozitif olmasıyla bu tabloya CMV'nin sebep olduğunu belirtmişlerdir. Transfüzyon sonrası CMV enfeksiyonlarının tanımlanması da 1970'li yıllarda seronegatif alıcıların transfüzyondan sonra seropozitif hale gelmesiyle yapılmıştır. Viral bulaşmanın, kandaki lökosit ve monositlerde latent olan CMV'nin alıcıda aktif hale gelmesiyle olduğu ileri sürülmüştür (19).

CMV, transplantasyon sonrasında hastalığa sebep olan etkenlerin başında gelmektedir. Transplantasyon türüne ve immün baskılanma seviyesine göre morbidite oranları değişmektedir. Kemik iliği alıcılarında 1986 yılında yapılan bir çalışmada en sık görülen komplikasyonun pnömoni olduğu ve mortalitenin %83 olarak hesaplandığı bildirilmiştir (20). O dönemde yapılan başka bir çalışmada renal transplant alıcılarında CMV pnömonisine bağlı mortalite oranları %50 olarak saptanmıştır (21). Sonraki yıllarda etkin tedavilerin kullanıma girmesiyle mortalite oranlarında azalma olmuştur.

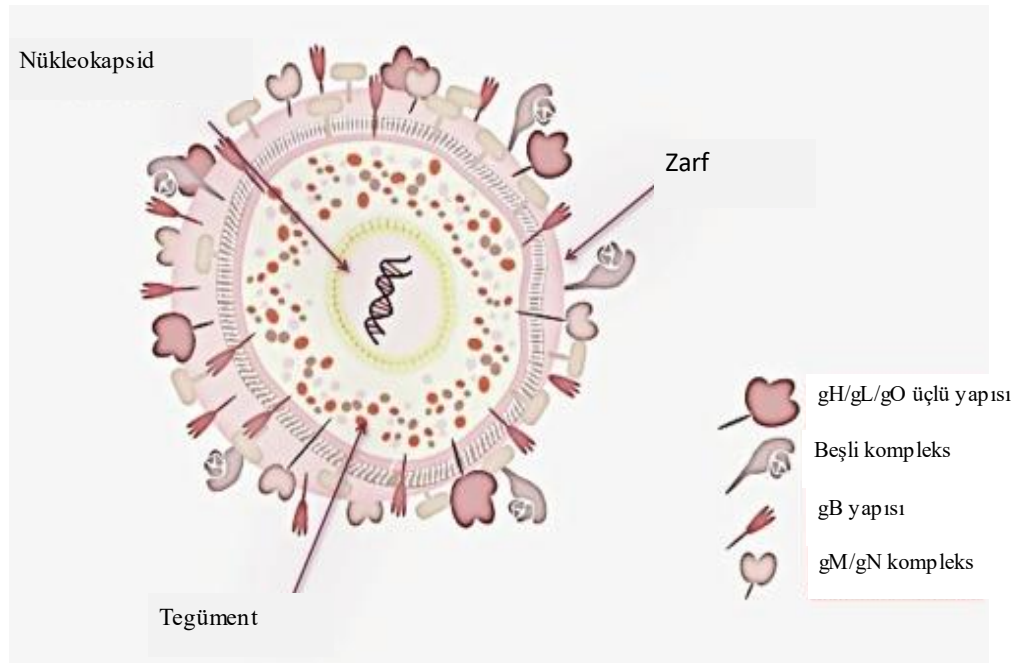
Kazanılmış immün yetmezlik sendromu (AIDS) pandemisinin 1980'lerde başlamasıyla birlikte ileri düzeyde immün baskılanmış hastalar, CMV enfeksiyonları için yüksek risk grubunu oluşturmuşlardır. Yüksek Aktiviteli Antiretroviral Tedavi (HAART) kullanımından önce AIDS hastalarında, CMV enfeksiyonları %30-%42 aralığındayken, bu oran HAART tedavisiyle birlikte azalmıştır (22).

CMV enfeksiyonlarının tedavisinin geçmişi de 1980 yılında gansiklovirin patent almasıyla başlamıştır. Klinik kullanıma girmeden önce, Herpes simpleks tip-1 (HSV-1) ve diğer Herpes virüslere karşı in vitro etkili olduğu bulunmuştur (23). Daha sonra AIDS hastalarında CMV retinit tedavisinde, transplant alıcılarında CMV pnömonisinde ve son 30 yıldır da CMV profilaksi ve tedavisinde ilk sıra ilaç olarak kullanılmaktadır.

Foskarnet, AIDS hastalarında CMV retinit tedavisinde kullanım onayı olan ikinci antiviral ilaçtır (24). Daha sonra gansiklovir tedavisine dirençli CMV enfeksiyonlarının tedavisi için kullanım onayı almıştır (25). Sidofovir, DNA virüslerine karşı geniş etki spektrumuna sahip antiviral ilaçtır. Dirençli CMV enfeksiyonlarında 1996 yılında kullanım onayı almıştır (26).

### 2.1.2 Virüsün Genel Özellikleri

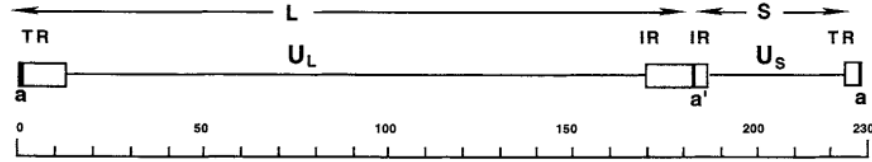
CMV, Uluslararası Virüsler Taksonomisi Komitesi (“International Committee on Taxonomy of Viruses”-ICTV) tarafından *Herpesviridae* ailesinin, *Betaherpesvirinae* alt ailesinde İnsan Herpesvirüs 5 (HHV-5) olarak tanımlanan zarflı bir DNA virüsüdür. Diğer herpesvirüslerde olduğu gibi CMV de doğrusal, çift zincirli DNA genomuna sahiptir. Genom büyüklüğü 235 kilo baz olup moleküler ağırlığı  $150-155 \times 10^6$  daltondur. Bu genom 162 kapsomerin birleşerek oluşturduğu ikozahedral bir kapsid ile paketlenmiştir. Kapsidin yaklaşık çapı 115 ile 130 nm arasındadır. Kapsidin etrafında da tegüment adı verilen, yapısal proteinlerden oluşan bir katman bulunur. Tüm bu nükleokapsid ve tegüment yapısı da içerisinde glikoprotein yapılar içeren ve lipid yapıda olan bir zarf tarafından sarılmıştır. Tam bir virion çapı ise 150 ile 200 nm arasında değişmektedir (27). CMV virion yapısı aşağıda verilmiştir (Şekil 2.1) (28).



**Şekil 2.1.** İnsan CMV virion yapısı ((28) numaralı kaynaktan Türkçeye uyarlanmıştır).

CMV, tüm herpesvirüsler içerisinde en büyük genoma sahip olan virüstdür. Yaklaşık 100 polipeptit kodlayan 208 tane açık okuma çerçevesi içerir. CMV genomu ‘unique long (UL)’ ve ‘unique short (US)’ adı verilen gen bölgeleri şeklinde organize olmuştur (Şekil 2.2). Bu genom dizilimi internal ve terminal tekrar bölgeleri

içermektedir. Tekrarlayan gen bölgelerinin özellikleri bilinmemekle birlikte DNA replikasyonuyla ilişkili olduğu düşünülmektedir (29).



**Şekil 2.2.** CMV genom organizasyonu. IR: internal tekrarlar, TR: terminal tekrarlar ((29) numaralı kaynaktan aynen alınmıştır).

CMV virion yapısı, herpesvirüslerin genel özelliklerine uygun olarak, birçok yapısal protein içermesine karşın, kapsid yapısı nispeten daha basit proteinlerden oluşmuştur. Konak hücrede ilk oluşan kapsid yapısına PreB kapsid denir. PreB kapsid genel olarak major kapsid proteini (pUL86), minör kapsid proteini (pUL46) ve küçük kapsid proteini (M1) olmak üzere en az üç yapısal proteinden oluşur (30). CMV kapsidi, PreB kapsid aşamasında iken en çok konak hücrenin çekirdeğinde bulunurken, oluşan PreB olgun B kapsid haline gelirken konak hücre sitoplazmasına çıkar. Bu olgunlaşma aşamasında 36-38 kilo dalton ağırlığında pUL80 adı verilen protein B kapsid yapısına katılır (31).

Major kapsid proteini (MCP), aynı zamanda enfekte hücre proteini 4 (ICP4) olarak da bilinir, CMV kapsid yapısının protein içeriğinin yaklaşık %90'ını oluşturur (32). CMV ve diğer herpesvirüslerin MCP nükleotit sekans benzerlikleri Epstein-Barr virüsü (EBV) ile %29, Varisella zoster virüs (VZV) ile %23, Human Herpesvirüs 6 (HHV-6) ile %43 olarak saptanmıştır (33). Doğal enfeksiyon sürecinde MCP'ine karşı spesifik antikorlar üretilmesine karşın, MCP güçlü bir immünojen değildir (34).

Minör kapsid proteini (mCP), pUL46 olarak da bilinir, kapsid protein yapısına çok az katılır. Bununla birlikte mCP, esas olarak CMV DNA'sının kapsid içerisinde tutunması için gereklidir (35). Minör kapsid proteinine karşı gelişen *in vivo* immün yanıt ve spesifik antikor üretimi için yeterli bilgi yoktur (30).

CMV tegüment yapısı kapsid ile virüs zarfı arasında kalan bölgeye denilmektedir. İnsan CMV tegüment bölgesinde en az yedi tane yapısal protein bulunmaktadır (30). Bu proteinlerin işlevleri tam olarak anlaşılamamıştır. Diğer

herpesvirüslerle birlikte düşünüldüğünde, bu proteinlerin viral genin düzenlenmesinde, konak hücre metabolizmasının modifikasyonunda ve virüsün zarflı hale gelmesi sürecinde rol aldıkları düşünülmektedir (36). CMV tegument proteinlerinin monoklonal ya da poliklonal antikor üretimini indüklemedikleri düşünülmektedir. Az da olsa üretilen bu antikorların da viral nötralizasyon özellikleri bulunmamaktadır (36).

Matriks proteinlerinden en bilineni, 65 kilo dalton ağırlığında olan ve *UL83* gen bölgesinden kodlanan pp65 proteindir. Yapısının fosforillenmesinden ve 65 kilo dalton özgül ağırlığından dolayı pp65 olarak adlandırılmıştır. Aynı zamanda 'lower matriks proteini' olarak da adlandırılmaktadır (32). Doğal enfeksiyon sırasında pp65 proteinini kodlayan mRNA, enfeksiyonun hem erken döneminde hem de geç dönemine üretilmektedir (37).

CMV pp65 antijeni, diğer tegument proteinlerinin aksine, immün yanıtı en çok uyaran yapısal proteinlerden biridir. CMV viremisi sırasında polimorfonükleer lökositlerin (PMNL) içerisinde bulunur ve tanı aşamasında antijenemi temelli testlerde hedef antijen olarak kullanılır (38). Bu protein aynı zamanda sitotoksik T lenfositler (CTL) için de hedeflenen viral antijenlerden biridir (39).

İnsan CMV zarf yapısı çift sıra lipit ve bu lipit yapının içerisinde bulunan glikoproteinlerden oluşmuş kompleks bir yapıdır. CMV genomunda zarf glikoproteinlerini kodlayan en az 55 tane açık okuma çerçevesi bulunur. Bu genlerin transkripsiyonundan sonra translasyon ve translasyon sonrası modifikasyon ile zarf glikoproteinleri sentezlenmiş olur. Bilinen yedi tane zarf glikoproteini vardır. Glikoprotein B (gB) ve glikoprotein H (gH) en bilinen zarf glikoproteinleridir ve sırayla *UL55* ve *UL75* gen bölgelerinden kodlanmaktadır (2). Diğer herpesvirüslerde olduğu gibi CMV zarf glikoproteinlerinin de konak hücre reseptörüne tutunma, hücre plazma membranına füzyon, sitoplazmaya geçiş, yeni oluşan virionların toplanması ve sonuçta bu virionların enfekte hücreden çıkışında görev aldığı bilinmektedir (40).

Glikoprotein B (gB) kompleksi virüs nötralizasyon eden antikorlar için major hedeflerden biridir (41). Bu özelliğinden dolayı insan CMV alt ünite aşılarda hedef

antijen olarak kullanılmaktadır. Ayrıca virüsün hücreden hücreye geçişini ve enfekte hücrelerin füzyonunu sağlar (42).

Glikoprotein H (gH), CMV ve HSV-1 için yapısal homoloji gösterir. İnsan CMV gH, gpUL75 gen bölgesinden kodlanır, virüsün konak hücreye tutunmasında yardımcı reseptör işlevi görür ve konak hücrede CMV replikasyonu için gereklidir. Yapılan *in vitro* deneylerde, bu glikoproteine karşı gelişen antikorlar, virüsün hücreden bir diğer hücreye geçişini engellemektedir (43).

### 2.1.3 CMV Replikasyon Döngüsü

İnsan CMV replikasyonu diğer herpesvirüsler ile benzerlik gösterir. İlk olarak virüsün gB ve gH zarf glikoproteinlerinin konak hücre yüzeyinde bulunan platelet kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) reseptörü, epidermal büyüme faktörü reseptörü, integrinler ve fibronektine tutunması ile enfeksiyon süreci başlar. Bu aşamadan sonra viral zarf ile konak hücre membranı arasında füzyon gerçekleşir ve virüs nükleokapsid yapısı hücre sitoplazmasına aktarılmış olur. Daha sonra nükleokapsid, hücre iskelet elemanları aracılığıyla hücre çekirdeğine ulaşır. Sonuç olarak virüs DNA'sı konak hücre çekirdeğine ulaşmış olur (5). CMV DNA'sının konak hücre çekirdeğine ulaşmasından sonra replikasyon döngüsü birbirini izleyen üç evre şeklinde gerçekleşir. Bu döngüler aşağıda sırayla açıklanmıştır.

#### *En Erken (IE) Replikasyon Fazı*

Bu döngü virüsün hücreye girişinden itibaren dört saat içerisinde meydana gelir. Alfa genleri de denilen en erken gen bölgelerinin transkripsiyonu gerçekleşir. Alfa genlerinin kodlanması konak hücrenin özelliklerine bağlıdır. Konak hücre CMV replikasyonuna izin verirse, en erken genlerin kodlanması ile major en erken proteinin sentezi gerçekleşir. Bu protein virüs replikasyonunun devam etmesinde ana rol oynamaktadır. CMV replikasyonuna izin vermeyen konak hücrelerde major en erken proteinin aktivitesi baskılanarak CMV replikasyonu durdurulmaktadır. Eğer viral replikasyon baskılanmaz ise, bu fazın sonlarına doğru konak hücre çekirdeğinde viral DNA polimeraz, viral protein kinaz gibi yapısal olmayan proteinler saptanabilir (44, 45)

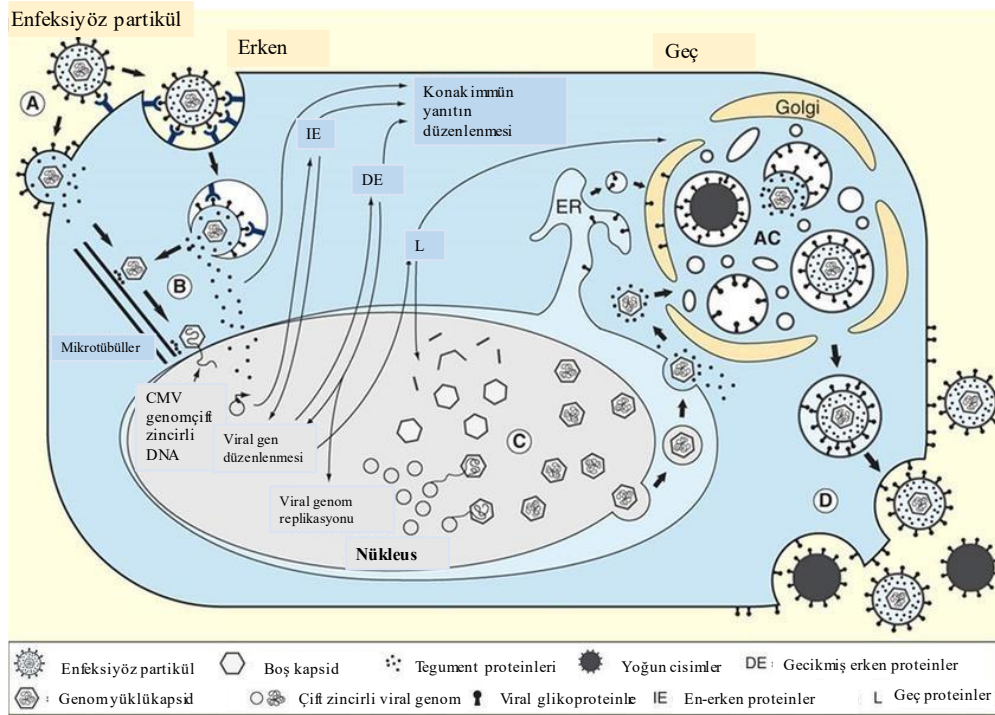
### ***Erken (E) Replikasyon Fazı***

Bu fazda, en erken replikasyon aşamasında sentezlenen transkripsiyon faktörlerinin etkisiyle, Beta genleri de denilen erken viral genlerin kodlanması gerçekleşir. Bu aşamada, viral DNA polimeraz ve helikaz-primaz gibi enzimler de dahil olmak üzere virüs replikasyonu için zorunlu olan proteinlerin sentezi tamamlanmış olur (44).

### ***Geç (L) Replikasyon Fazı***

Replikasyon döngüsünün geç fazı, enfeksiyon başlangıcından yaklaşık 24 saat sonra meydana gelir. Bu aşamada 'L (gama)' genlerinin transkripsiyonu gerçekleşir. Gama genlerinin ürünleri yapısal ve viral olgunlaşmaya yardımcı proteinlerden oluşmaktadır (44). Yapısal proteinlerin toparlanması ve virüs paketlenmesi konak hücre çekirdeğinde olur. Bu nükleokapsid yapısı zarfını da hücre çekirdeğinden alarak sitoplazmaya çıkar. Endoplazmik retikulum-Golgi cisimciği kompleksinden gelen CMV zarf glikoproteinlerinin virion yapısına eklenmesiyle birlikte virüs olgunlaşması tamamlanmış olur. Konak hücre parçalanması olana kadar tüm bu replikasyon aşamaları birkaç gün devam eder. CMV virüs replikasyon döngüsü aşağıda gösterilmiştir (Şekil 2.3) (44).





**Şekil Hata! Belgede belirtilen stilde metne rastlanmadı.2.3. CMV replikasyon döngüsü. A) Virüsün konak hücreye girişi B) Nükleokapsid yapısının çekirdeğe ulaşması C) Virüsün toparlanması D) Olgun virionun konak hücreden çıkışı ((46) numaralı kaynaktan Türkçeye uyarlanmıştır).**

#### 2.1.4 Epidemiyoloji ve Bulaş

CMV'nin bilinen tek enfeksiyon kaynağı insandır. Tüm dünyada ve tüm yaş gruplarında yaygın olarak görülmektedir. Seropozitiflik oranları gelişmiş ülkelerde %40-60 arasında iken, gelişmekte olan ülkelerde bu oran %90-100 arasındadır (3). Seroprevalans çalışmalarında CMV enfeksiyonlarının erken çocukluk dönemi ve cinsel aktivitenin başlamasıyla birlikte geç ergenlik döneminde en yüksek seviyelerine ulaştığı görülmektedir (5).

Ülkemizde CMV seroprevalansı gebeler başta olmak üzere çeşitli hasta gruplarında araştırılmış ve %85-100 arasında seropozitiflik bildirilmiştir. Ataman ve arkadaşları  $\geq 7$  yaşında olmanın, istatistiksel olarak CMV seropozitifliği ile anlamlı ilişki gösterdiğini bildirmişlerdir (47).

CMV; tükürük, semen, idrar, gözyaşı, dışkı, servikal ve vajinal sekresyonlar, anne sütü, kan gibi pek çok vücut sıvısında bulunduğu için; cinsel ilişki, kan transfüzyonu, solid organ veya kemik iliği transplantasyonu, emzirme ve virüsü saçan kişilerle yakın temas gibi çok çeşitli yollarla horizontal bulaş olabilmektedir. Kan transfüzyonları yolu ile CMV bulaş riski, transfüzyon sıklığına ve miktarına göre değişmekle birlikte, ünite başına %3 civarında olduğu düşünülmektedir. Kan transfüzyonları ile virüs bulaşmasında, enfekte lökositlerin sorumlu olduğu düşünülmektedir. Enfeksiyon gebelik döneminde geçirildiğinde ise vertikal yolla bulaş da söz konusudur ve fetus plasenta aracılığıyla enfekte olur (3). Gebe kadının CMV ile enfekte olma zamanı doğuma ne kadar yakın ise bebeğin CMV ile enfekte olma oranı da o ölçüde artış göstermektedir (48).

Virüs bulaştıktan sonra inkübasyon süresi 4-12 haftadır. Aktif enfeksiyon sonrasında virüs haftalarca idrar ve tükürük ile saçılmaya devam eder. Primer enfeksiyonun ardından CMV vücutta hayat boyu latent olarak kalır ve reaktive olarak viral saçılma yol açabilir. Reenfeksiyon da söz konusudur. Bulaşma yollarının yaygınlığı nedeniyle; CMV seropozitiflik oranları tüm toplumlarda yaşla birlikte artmaktadır (3).

Özel hasta gruplarından solid organ transplantasyonu yapılan hastalara nakil edilen organın alıcı tarafından reddedilmesini önlemek amacıyla immün sistemi baskılayıcı tedavi uygulanmaktadır. İmmün baskılanmanın sonrasında enfeksiyonlara sebep olan fırsatçı patojenler içerisinde en sık etkenlerden birisi CMV'dir. Organ transplantasyonu sonrasında primer CMV enfeksiyonuna bağlı CMV hastalığı gelişme riski %40-60 arasındadır. CMV hastalığı gelişmesi açısından en riskli durum alıcının seronegatif, vericinin seropozitif olmasıdır. Seronegatif alıcılarda nakledilen organdaki latent virüsün reaktivasyonu ile primer enfeksiyon gelişirken, seropozitif alıcılarda endojen latent virüsün reaktivasyonu ya da nakledilen organdaki virüsün reaktivasyonu sonucunda sekonder enfeksiyonlar gelişmektedir (3).

CMV, hematopoetik kök hücre nakli (HKHN) yapılan hastalarda da önemli fırsatçı enfeksiyon etkenlerinden biridir. Uygun profilaksi ve önleyici tedavi yapılmadığında allojenik transplant alıcılarının %50'sinde aktif enfeksiyon gelişir. Bu hastaların da yaklaşık %25'inde CMV hastalığı gelişir (3). Enfeksiyon ve hastalığın

gelişmesini belirleyen başlıca faktörler alıcı ve verici arasındaki doku antijeni uyum oranı, seropozitiflik durumu ile immün süpresyonun şiddeti ve süresidir (4). Kök hücre nakil tipleri arasında CMV enfeksiyonu ve hastalığı gelişme riski en düşük olan otolog nakillerdir (3).

İnsan immün yetmezlik virüsü (HIV) enfeksiyonuna bağlı gelişen immün yetmezlik durumu da CMV enfeksiyonlarına zemin oluşturmaktadır. HIV ile enfekte homoseksüel erkeklerin %90 oranında CMV ile eş zamanlı enfekte olduğu gösterilmiştir. CD4+ T lenfosit sayısının 100 hücre/mm<sup>3</sup> altına düşmesi CMV hastalığı gelişmesi açısından önemli risk oluşturmaktadır (3). Yüksek Aktiviteli Antiretroviral Tedavi (HAART) kullanımından önce AIDS hastalarında, CMV enfeksiyonları %30-%42 aralığındayken, bu oran HAART tedavisiyle birlikte azalmıştır (22)

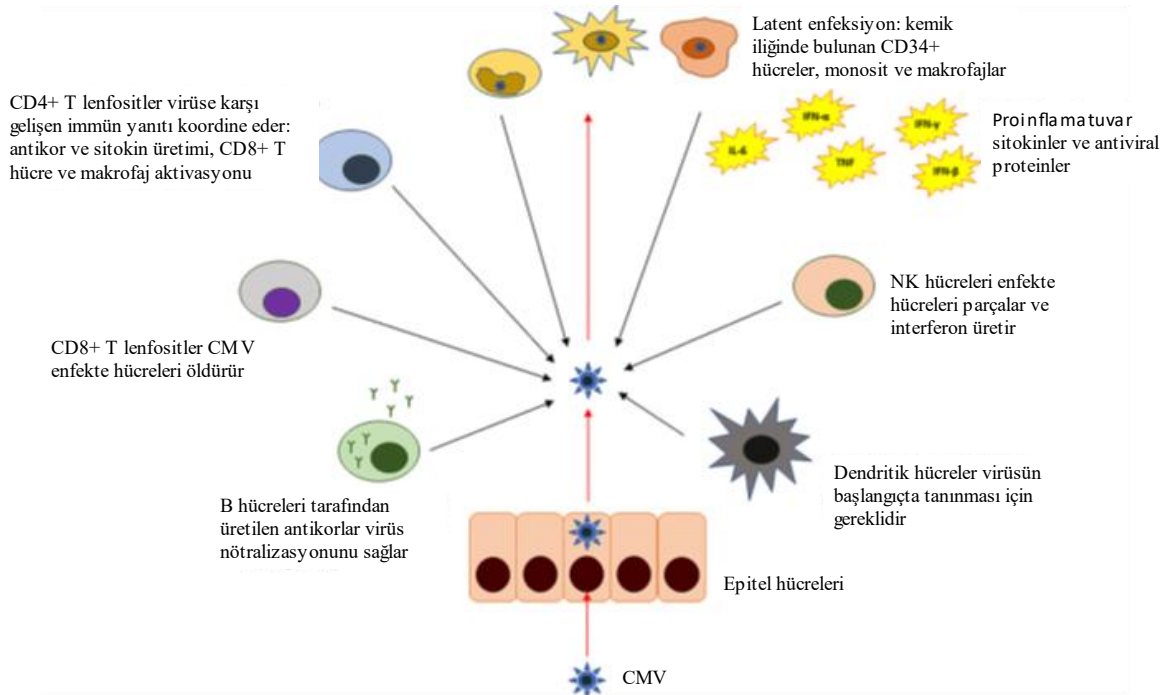
Konjenital CMV enfeksiyonlarının görülme oranı tüm canlı doğumlarda %0.2 ile %2.2 arasında değişmekle birlikte bu oranın gelişmemiş ülkelerde daha yüksek olduğu düşünülmektedir (5). Gebede primer enfeksiyon varlığında bulaş oranı %40-50 iken, sekonder enfeksiyonlarda bu oran %1 dolaylarındadır (3). Amerika Birleşik Devletleri'nde yılda yaklaşık 44.000 bebeğin konjenital CMV enfeksiyonu ile doğduğu düşünülmektedir. Bu bebeklerin doğumda %10 oranında semptomatik olduğu bilinmektedir (49).

### 2.1.5 Patogenez ve İmmünite

CMV patogenezi ve virüse karşı gelişen immün cevap konağın immün durumuna göre farklılık göstermektedir. İmmün sistemi normal konakta 4-8 haftalık inkübasyon döneminden sonra atipik lenfositlerin görülmediği enfeksiyöz mononükleoz tablosu ortaya çıkabilir. Bununla birlikte immün yetmezliği olmayan hastalarda CMV enfeksiyonları en sık asemptomatik geçirilir.

Primer enfeksiyondan sonra virüs saçılımı uzunca süre devam eder. Bu süreçte viral proteinlerin etkisiyle konağın hücresel immünitesi baskılanır. Baskılanan bu immüitenin virüsün latent olarak hücrelerde bulunmasına zemin oluşturduğu düşünülmektedir (5). HSV ve VZV gibi diğer herpesvirüsler belli dokularda latent kalırken, CMV vücutta çok değişik bölgelerde latent olarak kalabilir (5). Latent kalma

mekanizması tam anlaşılammakla beraber, virüs esas olarak CD34+ hücreler, CD14+ monosit ve makrofajlar ile dendritik hücrelerde latent kalmaktadır. CMV'nin bu hücrelerin dışında nötrofil, lenfosit gibi immün sistem hücrelerinde ve salgı bezlerinin epitel hücreleri ile böbrek tübül hücrelerinde latent kaldığı bilinmektedir (3, 45). Normal konakta gelişen immün yanıt virüsün yeniden aktif hale gelmesini baskılar. Hüresel immünite en önemli savunma mekanizması iken, humoral immünite virüsün nötralizasyonunda ve geçirilmiş enfeksiyonun tanısında faydalıdır (3). İmmün sistemi normal konağın CMV enfeksiyonuna verdiği doğal ve kazanılmış yanıt şekil 2.4'te görülmektedir (45).



**Şekil 2.4.** İmmün sistemi normal olan konakta CMV'ye karşı doğal ve kazanılmış bağışıklık yanıt ((45) numaralı kaynaktan Türkçeye uyarlanmıştır).

İmmün yetmezliği olan konakta ise primer CMV enfeksiyonları, normal konağa göre çok daha ağır seyredir. Yaygın enfeksiyon ile birlikte komplikasyonlar daha çok görülür ve virüsün saçılımı daha uzun sürer (4). Bu hasta grubunda sekonder enfeksiyonlarda en önemli aşama latent virüsün immün baskılamayla birlikte reaktive olmasıdır. İmmünopatogenez açısından reaktivasyonu belirleyen faktörlerin başında

immün süpresyon için kullanılan medikal tedavi ve süresi gelmektedir. Diğer virüs enfeksiyonlarında olduğu gibi, CMV enfeksiyonlarının kontrol altına alınmasında da T lenfositlerin aktivitesi esastır. Özellikle nakil alıcılarında immün süpresyon için kullanılan Mikofenolat mofetil, seçici olarak T ve B lenfositlerin üretimini baskılayarak CMV hastalığının görülme riskini artırmaktadır. Siklosporin, taklorimus ve anti-timosit antikolar da seropozitif hastalarda CMV reaktivasyonu insidansını artırmaktadır (45).

CMV, lenfosit ve monositlerde metabolik yolları etkileyerek bu hücrelerin sitokin üretimini ve üretilen sitokinlere yanıtını bozmaktadır. CMV, bellek T hücre yanıtını baskılamakta ve CD4+/CD8+ T lenfosit oranını tersine çevirmektedir. Aynı zamanda, *in vivo* koşullarda immün baskılayıcı özelliği bulunan interlökin-10 (IL-10) homologu üretmektedir. Halihazırda immün sistemi baskılanmış konakta, CMV'nin bu etkileriyle birlikte *Pneumocystis carinii*, *Aspergillus fumigatus* ve *Candida albicans* gibi fırsatçı patojenlere bağlı enfeksiyon riski daha da artmaktadır (3, 5).

## 2.2. Sitomegalovirüs Hastalıkları ve Klinik Bulgular

CMV'nin insanlarda oluşturduğu klinik tablolar; CMV enfeksiyonu, CMV sendromu ve CMV hastalığı şeklinde görülmektedir. Bu kavramların anlaşılması için literatürde bazı tanımlamalar yapılmıştır (50).

CMV enfeksiyonu; CMV'ye özgün semptom veya bulgular olmaksızın CMV replikasyonunun kanıtının olması şeklinde tanımlanmıştır. Plazma, serum, tam kan, periferik kan lökositleri, beyin omurilik sıvısı (BOS), bronkoalveolar lavaj (BAL) sıvısı ve idrar gibi herhangi bir vücut sıvısında veya doku örneğinde virüs izolasyonu, virüse ait antijenlerin veya nükleik asidin tespiti bu replikasyonu göstermek için kullanılabilir (50).

Primer CMV enfeksiyonu; daha önce CMV ile karşılaşmamış bir kişide CMV IgM ve CMV IgG serokonversiyonunun gösterilmesi şeklinde tanımlanmaktadır. Nakil alıcıları veya AIDS hastaları gibi immün yetmezlikli hasta gruplarında antikor yanıtında sorun olabileceği için CMV replikasyonunun vücut sıvılarından birinde veya dokuda saptanması ile de primer enfeksiyon tanısı konabilmektedir (50).

Sekonder CMV enfeksiyonu; tekrarlayan CMV enfeksiyonu olarak da adlandırılır. Daha önce CMV ile karşılaştığına dair kanıt olan kişide, yeniden CMV enfeksiyonunun saptanmasıdır. Bu iki tanı süresi arasında virüsün saptanmadığı en az dört haftalık bir zaman dilimi olmalıdır. Rekürren enfeksiyon, latent enfeksiyonun reaktivasyonu veya reenfeksiyon sonucu olabilir. Konakta latent halde bulunan virüsün (endojen CMV suşu) tekrardan enfeksiyon etkeni olmasına reaktivasyon denirken, hastanın başka bir CMV suşuyla (eksojen CMV suşu) enfekte olmasına reenfeksiyon denir (50).

CMV sendromu; sadece solid organ nakli yapılan hastalar için kullanılan bir tanımdır. Çünkü diğer hasta gruplarında CMV'ye özgün semptomlar başka etyolojilerden ayırt edilemez (50). CMV sendromu tanısı için gerekli şartlar Tablo 2.1'de verilmiştir.

CMV hedef organ hastalığı; CMV hastalığı olan organla uyumlu semptomlar ve tutulumu olan dokuda virüsün gösterilmesidir. Pnömoni, gastrointestinal tutulum (kolit vb.), hepatit, ensefalit, ventrikülit, nefrit, sistit, miyokardit ve pankreatit gibi klinik tablolar görülmektedir. Hedef organ hastalıkları 'kanıtlanmış CMV hastalığı' ve 'olası CMV hastalığı' şeklinde ikiye ayrılmaktadır.

Kanıtlanmış CMV hedef organ hastalığı, uygun klinik semptomların ve/veya belirtilerin yanında ilgili organ dokusundan CMV'nin histopatoloji, virüs izolasyonu, hızlı kültür, immünohistokimya veya DNA hibridizasyonu ile virüsün doku düzeyinde varlığının gösterilmesi esasına dayanmaktadır (50).

Olası CMV hedef organ hastalığı ise ilgili organa ait dokularda polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) gibi kantitatif NAAT ile tespit edilen yüksek virüs DNA seviyelerinin, özellikle eş zamanlı alınan kanda CMV DNA saptanmaması ile birlikte, muhtemel CMV hastalığını temsil ettiği kabul edilmektedir. Ancak viral yük sınır değerleri henüz tanımlanmamıştır. Dokudan elde edilen virüs yükünün olası hastalık tanımından kanıtlanmış hastalık tanımına gelebilmesi için sınır değer çalışmaları güncel araştırmaların önemli konularından biridir (50).

Sağlıklı erişkinlerde primer enfeksiyon sonrası CMV hastalığının görülme olasılığı oldukça düşüktür. Enfeksiyon genellikle asemptomatiktir. Nadiren iki haftadan uzun süren ateş, kas ağrıları, servikal lenfadenopatilerle giden mononükleozis

sendromuna yol açabilir. Bu klinik bulgular ile primer EBV enfeksiyonlarının etken olduğu mononükleoz tablosundan ayırt edilemez (51). Mononükleozis sendromu görülen olguların %8'inden CMV sorumludur. Olguların çok az bir kısmında artrit, hepatit, aseptik menenjit ve miyokardit görülebilir (3). Hastaların %5'inde GM2 gangliosidlere karşı gelişen otoantikolar sebebiyle Guillain-Barre Sendromu görülmektedir (52). İmmün yetmezliği olmayan konakta hastalık kısa sürede kendiliğinden iyileşir. Ancak yine de idrar, kan, semen, tükürük ve süt gibi vücut sıvılarından virüs saçılımı uzun süre devam eder. CMV enfeksiyonu asemptomatik olsa da CMV bulaştırabilir (5).

Konjenital CMV (cCMV) enfeksiyonu gelişmiş ülkelerde en sık görülen konjenital enfeksiyondur. Konjenital enfeksiyonda en önemli risk annenin primer CMV enfeksiyonu geçirmesidir. Enfeksiyonun ilk trimester içerisinde geçirilmesi de ayrıca riski artırmaktadır. Çünkü gebede bulunan antikolar virüsün plasenta yoluyla fetüse geçişini engellemektedir. Ancak var olan bu antikolar, intrauterin enfeksiyon gelişmişse fetüsün semptomlarını azaltıcı etki göstermez (53).

Konjenital CMV enfeksiyonunun klinik bulguları asemptomatik olgulardan ağır klinik belirtiler gösteren vakalara kadar geniş bir dağılım göstermektedir. Asemptomatik cCMV enfeksiyonu, konjenital CMV hastalığını düşündüren hiçbir anormallik olmaması ve işitmenin de normal olması şeklinde tanımlanmaktadır. Hafif semptomatik vakalarda hepatomegali, trombositopeni, karaciğer fonksiyon testleri (KCFT) yüksekliği görülebilir. Tüm bunlarla birlikte cCMV enfeksiyonu ile doğan bebeklerin %5-10'unda mikrosefali, ensefalit, üst motor nöron bozuklukları, mental retardasyon ve sensörinöral işitme kaybı (SNİK) gibi geri dönüşümsüz ağır klinik tablolar görülmektedir (54). Sensörinöral işitme kaybı CMV'nin en sık görülen sekeldir ve %10 cCMV vakasında tek bulgu olabilmektedir. Sonuç olarak tüm cCMV hastalarında mortalite oranı %4-8 arasındadır. Ağır hastalıkta mortalite oranı %30'a yükselir. Uzun dönem sekeller ise işitme kaybı, zekâ geriliği, görme kaybı ve nöbetlerdir (55).

Solid organ alıcılarında ve kök hücre nakli yapılan hastalarda kullanılan organlara özgün CMV hastalığı tanımları Tablo 2.1'de özetlenmiştir. Bu tablo genel itibariyle diğer immün yetmezlikli hasta gruplarında da kullanılmaktadır (50, 56).

**Tablo 2.1.** Transplant alıcılarında CMV hastalık tanımları

	<b>Kanıtlanmış CMV Hastalığı</b>	<b>Olası CMV Hastalığı</b>
<b>CMV sendromu</b>	Tanımlanmamış	Kandaki CMV'nin virüs izolasyonu, hızlı kültür, antijenemi veya kantitatif NAAT ile tespiti ve aşağıdaki 6 bulgudan 2 veya daha fazlasının varlığı <ul style="list-style-type: none"> <li>– En az 2 gün boyunca <math>\geq 38^{\circ}\text{C}</math> üzerinde ateş</li> <li>– Yeni ortaya çıkan veya artmış halsizlik veya yorgunluk</li> <li>– Lökopeni veya nütropeni</li> <li>– % 5 atipik lenfosit</li> <li>– Trombositopeni</li> <li>– Aminotransferazlarda 2 kez normal seviye üstü artış (Sadece karaciğer dışı nakil alıcılarında uygulanabilir)</li> </ul>
<b>CMV pnömonisi</b>	Pnömoni semptom ve bulguları (görüntülemeye yeni tutulum alanları, hipoksi, takipne) ile birlikte akciğer dokusunda CMV'nin histopatoloji, virüs izolasyonu, hızlı kültür, immünohistokimya veya DNA hibridizasyon teknikleri ile tespiti	Pnömoni semptom ve bulguları (görüntülemeye yeni tutulum alanları, hipoksi, takipne ve/veya nefes darlığı) ile birlikte BAL sıvısında CMV'nin virüs izolasyonu ve hızlı kültür ile tespiti veya CMV DNA'nın kantitatif NAAT ile tespiti.
<b>Gastrointestinal CMV hastalığı</b>	Alt ve/veya üst gastrointestinal semptomların varlığı ve makroskopik mukozal lezyonların varlığı ile birlikte CMV'nin dokuda histopatoloji, virüs izolasyonu, hızlı kültür, immünohistokimya veya DNA hibridizasyonu ile varlığının gösterilmesi. HKHN alıcılarında 'graft-versus-host hastalığı' (GVHD) varlığı ya da yokluğu belirtilmelidir.	Alt ve/veya üst gastrointestinal semptomların varlığı durumunda, makroskopik mukozal lezyonlar olmaksızın, CMV'nin dokuda varlığının gösterilmesi. CMV'nin kanda NAAT veya antijenemi ile tespiti tek başına CMV gastrointestinal hastalığının teşhisi için yeterli değildir. HKHN alıcılarında 'graft-versus-host hastalığı' (GVHD) varlığı ya da yokluğu belirtilmelidir.
<b>CMV retiniti</b>	CMV retiniti tanısında deneyimli bir oftalmolog tarafından karakteristik oftalmolojik bulguların görülmesi kesin retinit tanısı için yeterlidir. Atipik retinit bulgularının varlığında veya deneyimli oftalmolog olmadığı durumlarda, tanı CMV'nin vitreus	Tanımlanmamış



	sıvısında NAAT ile belgelenmesi ile desteklenmelidir.	
<b>CMV hepatiti</b>	Anormal karaciğer fonksiyon testlerine ek olarak CMV'nin karaciğer dokusunda histopatoloji, virüs izolasyonu, hızlı kültür, immünohistokimya veya DNA hibridizasyon teknikleri ile doku düzeyinde tespiti ve diğer hepatit nedenlerinin dışlanması gereklidir.	Tanımlanmamış
<b>CMV ensefaliti ve ventriküliti</b>	Santral sinir sistemi (SSS) semptomlarına ilaveten CMV'nin SSS doku biyopsisinde histopatoloji, virüs izolasyonu, hızlı kültür, immünohistokimya, DNA hibridizasyonu veya tercihen kantitatif NAAT ile tespit edilmelidir.	SSS semptomlarına ilaveten CMV'nin BOS'ta gösterilmesi (görünür kan bulaşı olmadan) ve anormal görüntüleme bulguları olması gereklidir.
<b>CMV nefriti</b>	Böbrek nakli yapılan hastada, böbrek fonksiyon bozukluğuyla birlikte, yapılan biyopsi örneklemesinde histopatoloji, virüs izolasyonu, hızlı kültür, immünohistokimya, DNA hibridizasyonu ile doku düzeyinde virüsün gösterilmesi ile tanı konulmaktadır.	Tanımlanmamış
<b>CMV miyokarditi</b>	Klinik olarak miyokardit bulguları olan hastadan yapılan kalp biyopsi örneklemesinde histopatoloji, virüs izolasyonu, hızlı kültür, immünohistokimya, DNA hibridizasyonu ile doku düzeyinde virüsün gösterilmesi ile tanı konulmaktadır.	Tanımlanmamış

CMV, HIV enfeksiyonu sonucu gelişen AIDS tablosunda önemli fırsatçı patojenlerden biridir ve bu hasta grubunda en sık sebep olduğu enfeksiyon retinittir. HAART tedavisi kullanılmadan önce HIV ile yaşayan bireylerde %25 oranında retinit görülmekteydi (54). CMV retinitisi ileri evre HIV ile yaşayan bireylerde yavaş ve ilerleyici bir hastalıktır. Kesin tanısı için biyopsi gerekmemektedir. Karakteristik göz dibi muayene bulguları ile tanı konulmaktadır (57).

HIV enfekte kişilerde ikinci en sık görülen klinik tablo gastrointestinal hastalıktır. Hastalar en çok yutma güçlüğü ve ağrılı yutma şikayetleri ile hastaneye başvurumaktadırlar (58). Kolonoskopik incelemede görünür kolit olmamasından, derin ülserlere kadar değişebilen aralıkta bulgular olabilmektedir (59). CMV pnömonisi daha nadir görülmektedir. Bronkoalveolar lavaj (BAL) sıvısında CMV'nin saptanması, her zaman etken olduğunu göstermemektedir (54).

**2.3. Sitomegalovirüsün Laboratuvar Tanısı** CMV enfeksiyonlarının tanısında kullanılan mikrobiyolojik testlerin hasta gruplarına özel avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. Seçilecek tanı testi hastanın klinik özelliklerine göre belirlenmektedir. Günümüzde CMV enfeksiyonlarının tanısında histopatolojik yöntemler, pp65 antijenemi testi, serolojik testler, moleküler testler ve viral kültür yöntemleri kullanılmaktadır (3). Bu yöntemler aşağıda ele alınmıştır.

### **2.3.1. Hücre Kültürü**

CMV enfeksiyon ve hastalıklarının tanısında, zaman alıcı, zahmetli ve pahalı olmakla birlikte hücre kültürü 'altın standart' yöntemdir (3). Klinik örnek olarak kan kullanılması duyarlılığın az olmasından dolayı tercih edilmemektedir. CMV enfeksiyonlarından sonra idrar ve oral sekresyonlarda virüs saçılımının aylarca sürmesi de tanı aşamasında hücre kültürü sistemlerinin özgüllüğünü azaltmaktadır (25). CMV'nin hücre kültürlerinde replikasyonu sonucu sitopatik etkinin ortaya çıkması da üç-dört hafta sürmektedir. Ayrıca bekleyen örneklerde virüsler enfektif özelliklerini hızla kaybetmektedirler. Hücre kültürlerinin avantajlı kısmı ise fenotipik antiviral ilaç duyarlılık testleri için uygun olmasıdır. Tüm bu özelliklerinden dolayı hücre kültür sistemleri CMV enfeksiyonlarının tanısında rutin laboratuvar pratiğinde yeri olmayıp referans laboratuvarlarda araştırma amacıyla kullanılmaktadır (3).

Konvansiyonel hücre kültürünün dezavantajları viral kültürün hızlı formu olan Shell-vial yöntemi ile aşılmaktadır. Bu yöntem sayesinde en erken veya erken virüs proteinlerine karşı monoklonal antikolar ile viral antijenler saptanmakta ve 24-48 saat içinde sonuç verilmektedir. Duyarlılığı çok yüksek olmasa da özgüllüğünün yüksek olması ve en geç 48 saat içinde sonuç verilebilmesi nedeni ile hızlı hücre kültürü

yöntemi tercih edilen bir yöntemdir (3). Bu yöntem, konvansiyonel hücre kültüründen daha avantajlı olsa da kPZR yöntemlerinin üstünlüğünden dolayı rutin tanı laboratuvarlarında yaygın olarak kullanılmamaktadır (25).

### 2.3.2. Histopatolojik İnceleme

Biyopsi örneklerinin Wright-Giemsa, Papanicolaou veya hematoksilin-eozin gibi boyalar kullanılarak histolojik olarak incelenmesi esasına dayanan CMV hastalığının tanısında kullanılan tanı testidir. Biyopsi ve otopsi materyallerinin elde edilen kesitlerde bazofilik intranükleer inklüzyonları olan karakteristik sitomegalik hücreler görülebilir. Nükleer inklüzyon; sınırı belirgin kromatin içerdiği ve etrafındaki alan nükleer membrana kadar uzandığı için ‘baykuş gözü’ görünümüne sahiptir. Karakteristik sitolojik değişikliklerin olması CMV enfeksiyonunu akla getirmektedir. Bu durumda çeşitli testlerle doğrulama yapılması önerilmektedir. Histopatolojik incelemenin duyarlılığı, CMV antijenlerini saptamak için immünohistokimyasal boyama kullanılarak ya da CMV nükleik asitlerinin saptanması için *in situ* hibridizasyon yapılarak artırılabilir (3, 60).

### 2.3.3. Antijenemi Testi (pp65 Testi)

PMNL’lerin içerisinde, CMV’nin alt matriks proteini olan pp65’i saptamaya yönelik hızlı, yarı kantitatif sonuç veren ve pp65’e karşı floresanla işaretli monoklonal antikolar kullanarak yapılan bir testtir. Kantitatif NAAT’nin klinik pratikte yaygın olarak kullanıma girmesinden önce CMV viremlerinin tanısında en sık kullanılan test olmuştur. Yarı kantitatif özelliğinden dolayı önleyici tedavilerin başlanmasında, hastalıkların tanı aşamasında ve verilen tedavinin izlenmesinde kullanılmaktadır (61).

Testin yapımı, hastanın periferik kanındaki PMNL’lerin santrifüj yardımı ile tek tabaka halinde lam üzerinde yayılmasıyla başlar ve ardından immün boyama yapılır. PMNL çekirdeklerinin elma yeşili renğinde floresanla boyanması pozitif sonuçtur. Sonuçlar pozitif hücre sayısının incelenen toplam PMNL sayısına oranı şeklinde verilmektedir. Bu yöntem hücre kültürü ile kanda CMV saptanmasından daha duyarlıdır. Pozitif sonuç aktif CMV enfeksiyonu ile uyumlu olarak düşünülmekteyken, düşük antijenemi düzeyleri genellikle asemptomatik enfeksiyon ile ilişkilidir (61).

Antijenemi testinin olumlu yanları, kullanım kolaylığı getirmesi, pahalı ekipmanlara ihtiyaç duyulmaması ve hasta sayısı az olan küçük laboratuvarlar için uygun olmasıdır. Deneyimli personel gerektirmesi, standardizasyonun eksikliği sebebiyle subjektif sonuçların ortaya çıkması ise testin olumsuz yanlarıdır. Bu yöntem ile hasta örnekleri saklanıp daha sonra çalışılmaz. Kan alındıktan sonra, örneğin stabilizasyon yetersizliğinden dolayı, en geç altı-sekiz saat içinde çalışılması gerekmektedir. Mutlak nötrofil sayısı 1000 nötrofil/ul ve altında olan hastalarda bu test yetersiz kalmaktadır (60).

#### **2.3.4. Moleküler Testler**

CMV enfeksiyonlarının laboratuvar tanısında kullanılan virüs hücre kültürü, histopatolojik inceleme ve antijenemi gibi testlerin çeşitli kullanım zorluklarının olması bu testlerin kısıtlı kalmasına yol açmıştır. Ayrıca son yıllarda moleküler tanıdaki gelişmelerle birlikte CMV enfeksiyonlarının tanısında NAAT en çok kullanılan tanı yöntemi haline gelmiştir (3). Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) kullanılarak tam kan, plazma, serum, idrar, BAL sıvısı, BOS, amniyon sıvısı ve oküler sıvılar gibi klinik örneklerde CMV DNA veya revers transkriptaz ile virüse ait mRNA dizilerinin çoğaltılarak saptanması amaçlanmaktadır. PZR yönteminin duyarlılığı, antijenemi testi ve hücre kültüründen yüksektir ve CMV enfeksiyonunu bu testlerden daha erken dönemde saptayabilmektedir (3).

Tanıda kullanılan PZR yöntemi kalitatif ve kantitatif olarak iki şekilde uygulanmaktadır. Kalitatif PZR testlerinde viral yük artışı belirlenememekte ve ayrıca latent virüs ile aktif replikasyona devam eden virüs ayırt edilememektedir. Bununla birlikte kalitatif PZR seronegatif transplant alıcılarının takibinde kullanılabilir. PZR yönteminin yüksek duyarlılıkta olması latent virüsün de saptanmasına yol açmaktadır. Kantitatif PZR (kPZR) ile bu latent virüs düzeylerinin takip edilebilmesi, önleyici tedaviye yol gösterici olması, uygulanan tedavinin yanıtının takip edilmesi ve dolaylı yoldan virolojik direnci göstermesi sayesinde günümüzde CMV enfeksiyonlarının tanısında ve tedavi takibinde vazgeçilmez hale gelmiştir. Pahalı ekipman ve sarf malzeme ihtiyacı, sonuçların değerlendirilmesi için alanında uzman hekim ihtiyacı ise kPZR tanı yönteminin dezavantajlarından (60).

CMV enfeksiyonlarının tanısında, ticari olarak üretilen ve yaygın kullanımda olan gerçek zamanlı kPZR platformları bulunmaktadır. CMV tanısında ve tedavisinde bu platformlarda tam kan ve plazma örnekleri kullanılmaktadırlar (25). Tam kan ve plazma örneklerinde bulunan virüs yükleri değişkenlik göstermektedir. Plazmada bulunan virüs DNA'sının stabilizasyon süresinin daha kısa olması ve plazmada bulunan viral DNA'nın parçalı halde olması gibi sebepler bu farkı oluşturmaktadır. Bu farklılığın önüne geçmek için laboratuvarlar hasta takibinde ya tam kan ya da plazma örneklerini kullanmaktadırlar (25).

Klinik laboratuvarlarda farklı gerçek zamanlı kPZR platformlarının bulunması alınan sayısal sonuçlarda anlamlı farklar olmasına yol açmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), viral kantitasyon değerleri arasındaki uyumu artırmak için 2010 yılında uluslararası kalibrasyon standartlarını yayınlamış ve ticari platformlar bu standartlara göre kalibre edilmiştir ve sonuçlar IU/mL olarak raporlanmaktadır (62). Uluslararası kalibrasyondan sonra belirli bir aşamaya gelinmiş ancak henüz beklenen standardizasyon sağlanamamıştır. Bu nedenle aynı örnekten farklı kPZR kitleri ile saptanan CMV DNA yükleri farklı olabilmektedir (63). Bu farklılıklar CMV DNA ekstraksiyon yönteminin farklı olması, hedeflenen gen bölgesi ve bu gen bölgesinin uzunluğunun farklı olması, kullanılan probların özgüllük ve duyarlılıklarının farklı olması, testlerin alt ve üst saptama sınırlarının farklı olması ve kantitasyon aralıklarının farklı olmasından kaynaklanmaktadır (64). Tüm bu sonuçlar dikkate alındığında, özellikle immün sistemi baskılanmış hasta sayısı fazla olan merkezlerde aynı klinik numune tipi ve aynı ticari platform üzerinden sonuç takibi yapılması tavsiye edilmektedir.

CMV enfeksiyonlarının tanısında ve tedavi takibinde kullanılan kPZR testlerinin hazırlık, uygulama ve yorumlama aşamalarında da dikkat edilmesi gereken noktalar bulunmaktadır (65). İlk olarak kullanılacak test DSÖ tarafından hazırlanan CMV uluslararası standardı ile kalibre edilmiş olmalı ve sonuçlar IU/mL olarak raporlanmalıdır. Kullanılan ticari platform bağımsız bir dış kalite kontrol programı tarafından test edilmelidir. Testlerde elde edilen kantitatif sonuçlar testin valide edildiği örnekler için geçerlidir. Test validasyonunun yapılmadığı örneklerde elde edilen kantitatif sonuçlar 'pozitif' şeklinde kalitatif olarak raporlanmalıdır. Bu

örneklerde elde edilen negatif sonuçlar örnekte virüs varlığını dışlayamamaktadır. Örnek toplama aşamasında dikkat edilmesi gereken nokta ise viral DNA kaybının en aza indirilmesidir. CMV DNA tam kan ve plazma içinde oda ısısında üç, 4°C’de en fazla beş gün boyunca bütünlüğünü korumaktadır. Plazmanın en kısa sürede ayrılması virüs DNA’sının parçalanmasını önlemek açısından önemlidir. Sonuçların yorumlanması aşamasında CMV replikasyon dinamiğinin bilinmesi önemlidir. CMV DNA miktarının tedavi yokken iki katına çıkma süresi seronegatif ve seropozitif bireylerde sırası ile ortalama 1.54 ve 2.67 gündür. Bu süreler hastanın altta yatan immün yetmezlik sebebi ve şiddetinden etkilenmektedir. Önleyici (preemptif) tedavi izleminde kPZR pozitifliğinin ardından, hızlı gelişebilecek virüs replikasyonunu yakalamak amacıyla testin haftada iki defa uygulanması önerilmektedir. Tedavi başladıktan sonra plazmada virüsün yarılanma ömrü üç-sekiz gün olduğu için CMV DNA takibi haftalık yapılmalıdır. Viral yük değişiminde, arada geçen zamana bakılmaksızın, iki ölçüm arasındaki farkın 0.5 log<sub>10</sub>’dan büyük olması biyolojik olarak anlamlı viral replikasyon göstergesidir (60).

### 2.3.5. Serolojik Testler

Hasta serumu ya da plazmasında CMV spesifik IgM ve/veya IgG antikorlarının saptanması için kullanılan testlerdir ve çoğunluğu enzim immün assay (EIA) prensibine göre çalışmaktadırlar. CMV enfeksiyonlarının tanısında CMV IgM ve CMV IgG saptayan testlerin kullanımı immün sistemi sağlıklı kişiler ve transplantasyon alıcı ve vericilerinin transplantasyon öncesi serolojik durumlarının belirlenmesi ile sınırlı kalmaktadır. Serolojik testlerin negatif olması kişinin CMV enfeksiyonuna duyarlı olduğunun göstergesidir (5).

Konjenital CMV enfeksiyonu tanısında CMV IgM antikorlarının yenidoğan kanında saptanması anlamlıdır ancak negatif olması tanıyı dışlamamaktadır. Gebeden plasenta ile fetüse geçen CMV IgG nedeni ile bu antikorların konjenital CMV enfeksiyon tanısında yeri yoktur. Doğumdan sonraki ilk üç hafta içerisinde yenidoğanın idrarında virüsün gösterilmesi konjenital CMV enfeksiyonu tanısında kabul edilen altın standart yöntemdir. Tanı aşamasında virüs kültürü ya da kPZR uygulanabilmektedir (25).

Genel olarak immün sistemi sağlıklı kişilerde primer CMV enfeksiyonlarını göstermede CMV IgM antikorlarının pozitifliği anlamlı olsa da tanı aşamasında tek başına kullanılmamaktadır (3). Akut EBV enfeksiyonu, akut viral hepatitler ve romatoid faktör pozitifliği gibi nedenlere bağlı olarak kanda yalancı CMV IgM saptanabilmektedir (66). CMV IgM tespitinde immün yakalama prensibi ile çalışan ve rekombinant antijenler içeren EIA kitleri ile duyarlılık ve özgüllük oranları artmıştır (3). Primer enfeksiyon sırasında CMV IgM pozitifliği ile birlikte iki-dört hafta ara ile alınan serum örneklerinde CMV IgG titresinde en az 4 kat artış saptanması da primer CMV enfeksiyonunda tanıya yardımcı olmaktadır. Bu durum kişide serokonversiyonun geliştiğini göstermektedir. CMV IgM ile birlikte düşük aviditeli CMV IgG antikorlarının varlığı primer enfeksiyon tanısını desteklemektedir.

Hem HKHN hem de solid organ nakillerinde, nakil öncesi alıcının ve vericinin CMV'ye karşı serodurumlarının belirlenmesi, nakil sonrası uygulanacak olan profilaksi veya önleyici (preemptif) tedavi yaklaşımlarına karar verilmesinde en önemli faktörlerden biridir. Kişilerin taranması amacıyla CMV'ye özgül IgG antikorlarını tespit eden bir serolojik testin kullanılması gerekmektedir (67). CMV IgM ve Total CMV antikor testlerinin özgüllükleri düşük olduğundan nakil öncesi verici ve alıcının taranması amacıyla kullanılmamaktadır. Kullanılacak serolojik testin yüksek düzeyde duyarlılık ve hassasiyetinin olması önerilmektedir. Alıcı veya vericiden birinin anti CMV Ig G negatifliği saptanırsa ve nakil bir aydan daha uzun sürede gerçekleşecekse test nakilden hemen önce tekrar edilmelidir (25). Nakil alıcısı olan hastalara bazen damar içi insan antikor (IVIG), trombosit ve plazma gibi kan ürünü transfüzyon ihtiyacı olabilmektedir. Bu transfüzyonlar sırasında antikor transferi olabileceğinden serolojik durumu belirlemede kullanılacak testler mümkünse bu ürünlerin kullanımından önce yapılmalıdır (68).

İndirekt hemaglutinasyon antikor (IHA) testi, nötralizasyon testi (NT) ve kompleman fiksasyon (KF) gibi yöntemler, CMV antikorlarını ölçmek için kullanılan diğer konvansiyonel serolojik testlerdir. Bu testlerin EIA testlerine göre en önemli dezavantajı antikor alt tipi ayırımını yapamamalarıdır. EIA testlerinin ticari olarak elde edilebilmesi, yüksek duyarlılık ve özgüllüklerinin olması konvansiyonel testleri rutin laboratuvar pratiğinde kullanılmaz hale getirmiştir (5).

## 2.4. Sitomegalovirüs Enfeksiyonlarının Tedavisi

CMV profilaksisinde ve CMV hastalığının önleyici tedavisinde (preemptif tedavi) antiviral ajanlar temel rol almaktadır. CMV enfeksiyonunun ve hastalığının önlenmesi için Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından kullanım onayı almış antiviral ajanlar; gansiklovir, valgansiklovir, foskarnet, sidofovir, letermovir ve maribavirdir. Oral gansiklovir ve fomivirsen klinik kullanımdan kaldırılmıştır (69). Bu ilaçlardan gansiklovir, valgansiklovir, foskarnet ve sidofovir CMV genomunda *UL54* gen bölgesinden kodlanan CMV DNA polimeraz enzimini inhibe etmekte ve virüs replikasyonunu engelleyerek antiviral etki göstermektedirler. Diğer antiviral ajanlara göre nispeten daha yakın dönemde kullanıma giren letermovir viral terminaz inhibitörü olarak etkisini göstermekte iken, maribavir ise virüs replikasyonunda önemli rolü olan pUL97 protein kinaz enzimini inhibe ederek CMV replikasyonunu spesifik olarak baskılamaktadır (70). CMV profilaksi ve tedavisinde kullanılan bu ilaçların sınıflandırması, etki mekanizması, klinik kullanım alanları ve yan etkileri aşağıda ele alınmıştır.

### 2.4.1. CMV DNA Polimeraz İnhibitörleri

#### *Gansiklovir (GCV) (intravenöz)*

Gansiklovir, CMV tedavi yönetiminde FDA onayı alan ilk antiviral ajandır. İlk kullanımının üzerinden üç dekat geçmiş olmasına rağmen CMV profilaksisi ve tedavisinde ilk sıra ilaç olma özelliğini korumaktadır. Gansiklovir, 2-deoksiguanozin analogu olan bir nükleozittir. Anti-CMV etkisini, *UL54* geni tarafından kodlanan CMV DNA polimeraz enzimi üzerinden göstermektedir. CMV DNA polimeraz enzimine bağlanmak için yarışa girerek yeni sentezlenen virüs DNA'sına katılmakta ve sentezlenmeye devam eden zincirin erken sonlanmasına sebep olmaktadır. Bu şekilde tam virüs genomu üretilmemekte ve virüs replikasyonu durdurulmaktadır. Gansiklovirin antiviral etkisinin ortaya çıkabilmesi için önce *UL97* gen bölgesinden kodlanan viral protein kinaz ile fosforillenmesi gerekmektedir. Viral protein kinaz tarafından ilk fosfor eklendikten sonra, konak hücrede bulunan, sırayla guanilat kinaz ve nükleozit difosfat kinaz enzimleri sayesinde gansiklovir trifosfat haline gelmektedir. Gansiklovir trifosfat ilacın aktif formu olup CMV DNA polimeraz



enzimini inhibe etmektedir. Gansiklovirin aktif hale gelip, antiviral etkisini gösterebilmesi için CMV'nin aktif replikasyonunun devam etmesi gerekmektedir. Bundan dolayı latent virüse karşı etkisi bulunmamaktadır ve virostatik etki göstermektedir (4, 25, 60, 69-72).

Gansiklovirin viral DNA polimeraza karşı olan ilgisi konak hücre polimerazına olan ilgisinden yaklaşık on kat daha fazladır (3). Bu durum antiviral etkinin seçiciliğini sağlamaktadır. Yine de gansiklovirin en önemli yan etkisi kemik iliğini baskılamasıdır. HKHN alıcılarında bu yan etki daha da ön plana çıkmaktadır ve özellikle nütropeni görülmektedir. Ateş, döküntü, bulantı, kusma, ishal, karaciğer ve böbrek hasarı gibi daha nadir yan etkileri de olabilmektedir (69-71). Gansiklovir, glomerüler filtrasyon ve aktif taşıma yolu ile renal tübüler sekresyona uğramaktadır. Tedavi edilen hastada bozulmuş böbrek fonksiyonları varsa doz ayarlaması gerekmektedir (69).

Gansiklovir, özellikle HIV ile yaşayan bireylerde CMV retinitis tedavisinde ve transplant alıcılarında CMV profilaksisinde FDA tarafından kullanım onayı almıştır. Bu endikasyonlar haricinde CMV hastalıklarının tedavisinde ve hastalığın gelişmesini önleyici yaklaşımda kullanılmaktadır (70). Böbrek fonksiyonu normal hastalarda önerilen tedavi gansiklovir (IV) 2x 5mg/kg/gün şeklindedir (25). Uygun tedavi süresi hastanın tedavi yanıtı ve vireminin düzelmesi ile kişisel bazda yapılmaktadır. En kısa tedavi süresi iki hafta olmalıdır. Tedavinin ardından hastanın klinik özelliklerine göre gansiklovir (IV) 5mg/kg/gün olacak şekilde idame tedaviye geçilebilir. Tedavi süresince haftalık viremi takibi yapılmalıdır. Ardışık iki negatif sonuç bulununca tedavi sonlandırılabilir. Tedavi sırasında özellikle ilk iki hafta viral yük azalmayabilir, bu durum tedavi değişikliği gerektirmemektedir (8, 25). *UL97* gen bölgesinde meydana gelen bazı mutasyonlar sonucu gansiklovir fosforillenememekte ve aktif gansiklovir trifosfat haline gelememektedir. Literatürde gansiklovire karşı gelişen viral direnç en sık *UL97* genindeki mutasyonlar sonucunda ortaya çıkmaktadır (73). Ayrıca CMV DNA polimeraz enzimini kodlayan *UL54* geninde meydana gelen mutasyonlar da aktif haldeki gansiklovirin, CMV DNA polimeraz enziminin ilgili kısmına bağlanmasını engellemekte ve viral dirence sebep olmaktadır (70). Gansiklovire karşı gelişen viral direnç, antiviral direnç başlığı altında ayrıntılı olarak ele alınacaktır.

### ***Valgansiklovir (VGCV)***

Valgansiklovir, gansiklovirin L-valil ester formu olup bir ön ilaçtır (69). Oral yoldan kullanılır ve %60 biyoyararlanıma sahiptir. Bağırsaklardan emildikten sonra bağırsak ve karaciğer hücrelerinin ürettiği esterazlar tarafından yıkılarak gansiklovire dönüşmektedir. Plazmada tepe konsantrasyonuna bir-üç saat içerisinde ulaşmaktadır (74). CMV enfeksiyonlarının tedavisinde klinik etkinliği kanıtlanmıştır (75). Valgansiklovirin klinik kullanım alanları, yan etkileri ve viral direnç gelişme özellikleri gansiklovir ile tamamen aynıdır (71). Oral tedavi kullanabilecek olan ve GI emilim şüphesi olmayan hastalarda valgansiklovir CMV tedavisinde kullanılabilir. Valgansiklovir tedavi dozu günde iki kez 900 mg iken idame dozu günde 1 kez 900 mg valgansiklovir şeklindedir (8, 69). Böbrek fonksiyonlarına göre doz ayarlaması gerekmektedir. Tedavi takibi ve tedavinin sonlandırılması gansiklovir tedavisiyle aynıdır (25).

### ***Foskarnet (FOS)***

Pirofosfat analogu olan bu ilaç *UL54* gen bölgesinden kodlanan CMV DNA polimeraz enzimine yarışmasız olarak bağlanmakta ve bu enzimin çalışmasını engelleyerek virüs replikasyonunu baskılamaktadır (76). Gansiklovir kadar etkili olmasına rağmen genellikle ikinci sıra ilaç olarak kullanılmaktadır. Antiviral aktivite için fosforillenmeye ihtiyacı olmadığından *UL97* gen bölgesindeki mutasyonlara bağlı olarak gansiklovire dirençli hale gelen CMV enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılmaktadır. Ayrıca gansiklovir kullanımının kontrendike olduğu hastalarda tedaviye alternatif olmaktadır. Nakil alıcılarında CMV proflaksisi için kullanılması önerilmemektedir. Sadece intravenöz uygulaması mevcuttur. Yüksek oranda böbrek toksisitesi ve elektrolit bozukluğu yapması en önemli yan etkilerindedir. Foskarnet tedavisi sürecinde hastaların böbrek fonksiyonları ve serum elektrolit düzeyleri yakından izlenmelidir. Baş ağrısı, ishal ve ateş daha nadir görülen yan etkilerindedir (4, 8, 69-71). CMV enfeksiyonlarının tedavisinde foskarnet 60 mg/kg, günde iki kez damar içine (IV) verilecek şekilde uygulanmaktadır. CMV DNA polimeraz enzimini kodlayan *UL54* gen bölgesinde meydana gelen mutasyonlar foskarnet tedavisine karşı viral dirençte rol almaktadır (4, 25, 70, 72, 77).

### ***Sidofovir (CDV)***

Sidofovir, asiklik yapıda 2-deoksitidin monofosfat analogu olan bir nükleotittir. Adenovirüs ve herpesvirüsler gibi çeşitli DNA virüslerine karşı antiviral etkinlik göstermektedir (78). Doğal yapısındaki fosfat grubu nedeniyle viral enzimlerce fosforilasyonu gerekmemektedir. Konak hücrede bulunan kinaz enzimleri sayesinde aktif formu olan sidofovir difosfat haline gelmektedir. Aktif formuna geldikten sonra CMV DNA polimeraz enzimine bağlanmakta ve DNA sentezini inhibe ederek viral replikasyonu durdurmaktadır (4, 69-71). Sidofovirin sadece damar içi uygulaması mevcuttur. Brincidofovir, sidofovirin oral formu olup, klinik çalışmalara girmiştir. Sidofovirin plazma yarılanma ömrü yaklaşık 2.5 saat olmakla birlikte hücre içerisinde yarılanma ömrü 24 saatten daha uzundur. Bu özelliği sayesinde haftada bir doz uygulama kolaylığı bulunmaktadır. Vücuttan glomerüler filtrasyon ve tübüler sekresyon ile atılmaktadır (69).

Sidofovirin, CMV enfeksiyonlarının tedavisinde kullanımı yan etkilerinden dolayı geri planda kalmaktadır. Böbrek fonksiyon bozukluğu olmayan AIDS hastalarında, CMV retiniti tedavisinde FDA tarafından kullanım onayı verilmiştir (69). Bu kullanımının dışında gansiklovir tedavisine yanıt vermeyen CMV enfeksiyonlarının tedavisinde ikinci sıra ilaç olarak kullanılmaktadır (4, 69). Sidofovirin en önemli yan etkisi böbrek hasarı yapmasıdır. Hidrasyon ile bu hasar azaltılabilmektedir. Göze karşı toksik etkileri bulunmaktadır. Baş ağrısı, saçlarda dökülme, kaşıntı ve vücutta döküntü diğer görülen yan etkileridir (70). CMV DNA polimeraz enzimini kodlayan *UL54* gen bölgesinde görülen bazı mutasyonlar sidofovire karşı dirençten sorumludur. Bu mutasyonlar gansiklovirle çapraz dirence sebep olmaktadırken sidofovire karşı tek başına görülen mutasyonlar daha nadir gelişmektedir (70-72)

### **2.4.2. Viral Terminaz İnhibitörleri**

#### ***Letermovir (LMV)***

Letermovir, CMV genomunda *UL56*, *UL51*, *UL89* gen bölgeleri tarafından kodlanan viral terminaz kompleksini inhibe eden bir 3,4-dihidro-kinazolin-4-il-asetik asit türevidir (79). Bu viral terminaz kompleksi, sentezlenen CMV DNA'sının ileri

işlem aşamalarında ve kapsid proteinleri tarafından paketlenmesi sürecinde görev almaktadır. Letermovirin etkisi, virüs DNA sentezini inhibe eden CMV DNA polimeraz inhibitörlerinin aksine, uzun DNA sentezlerinin bireysel viral alt birimlere bölünmesinin önlenmesidir. Bu sayede bulaşıcı özelliği olmayan uzun DNA partikülleri elde edilmektedir (4, 69, 80). Letermovir, CMV için oldukça spesifiktir ve diğer herpes virüslere karşı etkinliği bulunmamaktadır. Yapılan *in vitro* deneylerde, letermovirin çok düşük medyan etkili konsantrasyonla (EC50) CMV'ye karşı en etkili molekül olduğu gösterilmiştir (79).

Letermovirin hem ağızdan hem de damar içi kullanımı bulunmakta ve günde bir kez 480 mg oral tablet veya damar içi enjeksiyon şeklinde uygulanmaktadır. Letermovir ağızdan alındıktan sonra hızla emilmekte ve siklosporin varlığında biyoyararlanımı %35'ten %85'e yükselmektedir. Letermovirin vücuttan atılımı karaciğerden safraya sekresyon şeklinde ve oradan da dışkı yoluyla olmaktadır (69). Siklosporin varlığında biyoyararlanımdaki artışın sebebi, siklosporinin karaciğerde letermoviri hücre içine alan reseptörleri inhibe ederek yıkımını azaltmasından kaynaklanmaktadır (81). Letermovir, gansiklovirin aksine, kemik iliğini baskılamamakta ve böbreğe toksik etkisi bulunmamaktadır. Bu sebepten dolayı böbrek hasarı olan hastalarda doz ayarlaması gerekmez. Letermovirin sık görülen yan etkileri mide bulantısı, kusma, ishal, karın ağrısı, periferik ödem, öksürük ve yorgunluktur (69).

Letermovir Kasım 2017'de, CMV seropozitif allojenik HKHN alıcılarında CMV enfeksiyonunu ve hastalığını önlemek için FDA'dan kullanım onayı almıştır (70). Bu onayın ardından, HKHN alıcılarında CMV enfeksiyonlarının takibi için tercih edilen yöntem olan önleyici (preemptif) tedavi yaklaşımına alternatif olarak profilaksi amacıyla letermovir kullanılması gündeme gelmektedir (82). FDA, Haziran 2023 itibarıyla, vericinin pozitif alıcının negatif (D+/R-) olduğu yüksek riskli erişkin böbrek nakli alıcılarında CMV hastalığının önlenmesine yönelik letermovir için yeni endikasyonunu onaylamıştır (83).

Letermovirin etki mekanizması diğer anti-CMV ilaçlardan farklı olduğu için çapraz direnç beklenmemektedir (84). Ayrıca yapılan bir deneysel çalışmada, daha önce letermovir tedavisi almamış hastalardan izole edilen CMV suşlarında letermovire

karşı primer direnç saptanmamıştır (85). Letermovir bu özelliklerinden dolayı, CMV DNA polimeraz inhibitörlerine yanıtız enfeksiyonların tedavisi için umut vaat etmektedir. Ancak hem deneysel hem de klinik çalışmalarda CMV'nin letermovire karşı direnci saptanmıştır. Letermovir direncine sebep olan mutasyonlar en çok *UL56* gen bölgesinde özellikle 231–369 arası kodonlarda yoğunlaşmaktadır. Daha az yaygın olarak da *UL51* ve *UL89* mutasyonları letermovire karşı direncin ortaya çıkmasıyla ilişkilendirilmektedir (69, 86, 87).

### 2.4.3. Protein Kinaz İnhibitörleri

#### *Maribavir (MBV)*

CMV'nin replikasyonu ve yeni enfektif virionların oluşması için *UL97* gen bölgesinden kodlanan *UL97* protein kinaz (pUL97) enzimi gerekmektedir. Maribavir, ATP ile yarışmaya girmekte ve pUL97 tarafından proteinlerin fosforillenmesini engelleyerek antiviral etki göstermektedir (88). CMV'ye karşı özgül antiviral aktiviteye sahiptir. Hücre içi fosforilasyona uğraması gerekmemektedir ve etki mekanizması CMV DNA polimeraz enziminden bağımsızdır. Maribavir ayrıca gansiklovir ve/veya sidofovire dirençli bazı CMV suşlarına karşı in vitro aktiviteye sahiptir. Bununla birlikte, *UL97* gen bölgesinde meydana gelen mutasyonlar sebebiyle viral protein kinaz enzimi üzerinde ATP'nin bağlanma bölgesi değişebilmektedir. Bu mutasyonlardan bazılarının maribavire karşı in vitro direnç kazandırdığı kanıtlanmıştır. Maribavire dirençli CMV suşları genellikle gansiklovire duyarlı kalmaktadır ve bunun tersi de geçerlidir (69, 72, 89-91). Ancak maribavir, *UL97*'yi inhibe ettiğinden dolayı, gansiklovirin fosforilasyonunu engellemektedir. Bu ters etki, her iki molekülün birlikte uygulanmasına imkân vermemektedir. Bu olası etkinin, maribavir ve foskarnetin birlikte uygulandığında gözlenmediği varsayılmaktadır (71, 92).

FDA, nakil sonrası CMV enfeksiyonu ya da hastalığı olan, etkin tedaviye yanıt vermeyen yetişkin ve çocuk hastaların (12 yaş ve üzeri ve en az 35 kilo ağırlığında) tedavisi için maribavire kullanım onayı vermiştir. Bu kullanım onayı için mevcut antiviral tedaviye karşı dirence neden olan viral genetik mutasyonun ispatlanması gerekmemektedir (93). Yakın dönemde yapılan klinik çalışmalar, maribavir

tedavisinin yan etkilerinin gansiklovir ile tedavi edilen hastalarda gözlenene kıyasla daha az olduğunu ortaya koymaktadır. Gansiklovire kıyasla, kemik iliğini daha az baskıladığı ve böbrek hasarına daha az sebep olduğu gösterilmiştir (71). En yaygın yan etki doza bağlı gelişen ağızda metalik veya acı tattır. Diğer yan etkiler baş ağrısı, bulantı, ishal, döküntü ve yorgunluktur (69, 72, 94).

## **2.5. CMV’de Antiviral İlaç Direnci**

İlaç direnci, bir veya daha fazla antiviral ilaca karşı duyarlılığı azaltan viral genetik değişiklik olarak tanımlanmaktadır. Normalde etkili bir antiviral tedavi dozu ve süresinden sonra kalıcı veya artan viral yük ya da semptomatik hastalığın devam etmesi şeklinde ortaya çıkabilmektedir. Bu klinik özellikler kendi başlarına ilaç direncinin mevcut olduğu anlamına gelmemektedir. Ancak antiviral ilaç dirençleri sayesinde alternatif tedavi ihtiyacı belirlenebilmekte ve gerekirse immün baskılayıcı tedavinin dozu azaltılabilmektedir (25).

### **2.5.1 Antiviral İlaç Direnç Testlerinin Önemi**

İlaça dirençli CMV enfeksiyonunun gelişimi için risk faktörlerinin tanınması, antiviral direncin erken teşhisini ve yönetimini sağlayabilmek için önemlidir. Bu risk faktörleri konağa ya da virüse bağlı olabilmektedir. Uygun tedaviye rağmen CMV viral yükünün düşmemesi, uygun tedavi alırken ilk düşüşten sonra CMV viral yükünün tekrardan artması, aralıklı düşük düzey CMV viremisi ve yüksek düzeyde olan CMV viral yükleri virüse ait risk faktörlerini oluşturmaktadır (25, 95). Uzun süreli antiviral ilaç maruziyeti (>3 ay), önceki antiviral ilaç maruziyeti, tekrarlayan CMV enfeksiyonu varlığı, yetersiz antiviral ilaç Emilimi ve biyoyararlanımı olması, tedavi dozunun altında kalan antiviral ilaç düzeyi, ilaç rejimine zayıf hasta uyumu, haploidentik, allojenik veya kordon kanı HKHN alıcısı, anti-timosit antikorlarla tedavi, aktif GVHD olması, erken yaş ve konjenital immün yetmezlik sendromları ise konağa ait risk faktörleridir (8, 25, 95).

Risk faktörleri ile standart tedaviye klinik yanıtızsızlık durumlarının birlikte var olması antiviral direnç testlerine olan ihtiyacı oldukça ön plana çıkarmaktadır. Standart tedaviye yanıtızsız CMV enfeksiyonu, en az iki haftalık uygun dozda antiviral tedaviden sonra artan (>1 log<sub>10</sub> artış) CMV viremisi (DNAemi veya antijenemi) olarak

tanımlanmaktadır. Olası tedaviye yanıtızsız CMV enfeksiyonu ise en az iki haftalık uygun dozda antiviral tedaviden sonra CMV viremisinin (DNAemi veya antijenemi) aynı seviyede (virüs yükündeki azalma  $<1 \log_{10}$ ) kalması olarak tanımlanmaktadır. CMV viremi çalışılan laboratuvarın ve test yönteminin aynı olması gerekmektedir. Bu tanımlara uyan hastalardan elde edilen CMV suşlarına antiviral direncin olup olmadığını saptamak amacıyla direnç testlerinin uygulanması önerilmektedir (8, 25, 72, 95).

Antiviral ilaç direncinin laboratuvar tanısı için fenotipik testler ve genotipik testler olmak üzere iki uygulama şekli bulunmaktadır. Fenotipik testler ilk geliştirilen testler olup antiviral tedaviye yanıt olarak hedef genlerde ortaya çıkan mutasyonların tanımlanması ve karakterize edilmesinde büyük önem taşımaktadırlar. Fenotipik yöntemler, laboratuvar tanı pratiği için çok zaman alıcıdır, ancak günümüzde antiviral ilaç direncinin tanısı için rutin olarak kullanılan genotipik testlerin doğrulanması için gerekli olmaya devam etmektedir (4, 72). Genotipik testler ise hızlı oldukları ve fenotipik testlere göre objektif sonuçların ortaya çıkmasını sağladıkları için tercih edilen yöntem haline gelmişlerdir (4, 72).

### **2.5.2 Antiviral İlaç Direnç Tespitinde Kullanılan Fenotipik Yöntemler**

İlaç direncini tespit etmeye yönelik fenotipik yöntemler, hücre kültüründe virüs replikasyonunun belirli bir miktarda engellemek için gereken ilaç konsantrasyonunun belirlenmesi esasına dayanmaktadır. Bu işlem, içerisinde enfektif virüs sayısı bilinen bir inokulumun hazırlanmasını gerektirmektedir. Testlerin yorumlanması ilacın varlığında ve yokluğunda kantitatif viral replikasyonun tespiti ile olmaktadır. Hücre kültüründe ve viral replikasyonun tespitinde yer alan adımlar testler arasında farklılık göstermektedir. Her ilaç için sınır seviyeleri, onaylanmış ilaçların her birine duyarlı olduğu bilinen virüs suşları kullanılarak belirlenmiştir. Bunlar arasında *AD169* ve *Towne* gibi laboratuvar suşları ve bu ilaçlara hiç maruz kalmamış hastalardan izole edilen klinik suşlar bulunmaktadır (72). CMV tedavisinde kullanılan antiviral ilaçlara karşı direnci saptamak için kullanılan fenotipik testler plak redüksiyon testi, haberci hücre kültürü serileri, işaretleyici (marker) transfer eden yöntem ve kantitatif gerçek zamanlı PZR olarak karşımıza çıkmaktadır (4, 72).

CMV ilaç duyarlılığının fenotipik olarak tespiti için altın standart yöntem plak redüksiyon testi (PRA) olmuştur. Hücre kültüründe farklı antiviral ilaç konsantrasyonlarının varlığında yeni oluşan viral plakların sayısına dayalı olarak viral direnç saptanmaktadır. Bununla birlikte, PRA'nın deneyler arası ve özellikle laboratuvarlar arası standardizasyonun güç olması, teknik zorluklar ve genellikle testin zayıf tekrarlanabilirliği nedeniyle rutin laboratuvar pratiğinde kullanımı sınırlı kalmıştır (4, 72).

Hücre kültüründe CMV replikasyonunu tespit etmek için kullanılan diğer yöntem, haberci hücre kültürü serileridir. Bu amaçla kullanılan hücre hattı, CMV replikasyonun kontrolü altında bir haberci gen, örneğin lusiferaz taşımaktadır. Bu yöntemde ilk olarak araştırılan virüs suşunun *UL54* bölgesine lusiferaz enzimini kodlayan genin promotör bölgesi klonlanır. Ardından, daha önceden hazırlanan ve artan ilaç konsantrasyonlarının olduğu hücre kültürü kuyucuklarına belli miktarda bu virüsler inoküle edilerek enfeksiyonun gerçekleşmesi beklenir. Daha sonra bu kuyucukların içerikleri, lusiferaz aktivitesi rekombinant CMV'ye bağlı olan hücre serilerine inoküle edilip virüs replikasyonu için beklenir. İkinci kez inokülasyon yapılan kuyucukların lusiferaz aktiviteleri ile fenotipik direnç arasında ilişki kurulmakta ve test sonucu yorumlanmaktadır. Bu yöntemin en önemli kısıtlılığı ise farklı hücre serileri arasında standardizasyonun olmamasıdır (4, 72, 96)

CMV antiviral ilaç direncini saptamak için kullanılan başka bir yaklaşım ise kantitatif gerçek zamanlı PZR olmuştur. Antiviral ajanın farklı konsantrasyonlarına bağlı olarak hücre kültüründeki CMV genom kopyalarının azalan sayısının ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Bu yöntemin en önemli kısıtlılığı enfektif virion ile enfektif yeteneği olmayan virüs ayırımını yapamamasıdır. Diğer fenotipik testlere göre pahalı olması da başka bir dezavantajdır (97).

Rekombinant CMV virüsleri üretmek ve belirli genetik değişikliklerin viral duyarlılık ve antiviral ilaçlara direnç üzerindeki etkisini saptamak için işaretçi (marker) transfer yöntemi geliştirilmiştir. Bu yöntemde, hücre dışına salınabilen alkalin fosfataz enzimi üreten gen, CMV genomunun *US3-US6* bölgesine klonlanmaktadır. Ardından bu CMV suşunda araştırılan bölgeye özgül mutasyon gerçekleştirilmektedir. Daha sonra artan konsantrasyonlarda antiviral ilaç



konsantrasyonundaki hücre serilerine rekombinant virüsler inoküle edilir. Araştırılan mutasyon ilaca direnç sağlamakta ise, CMV replikasyonu gerçekleşmekte ve alkalin fosfataz üretilerek hücre dışına atılmaktadır. Kültür süpernatantında bulunan alkalin fosfataz, kemilüminesan bir substrat kullanılarak miktarı tayin edilmektedir. Bu yöntemin daha objektif sonuçlar vermesi ve standardizasyonunun sağlanmasıyla birlikte fenotipik testler arasında en çok tercih edilen yöntem haline gelmiştir (4, 72, 98).

Fenotipik testlerinin tamamında bulunan önemli bir kısıtlılık alınan klinik numunedeki ilaca dirençli ve duyarlı virüs alt popülasyonlarının oranıdır. Eğer alınan numunedeki dirençli popülasyon replikasyonunu devam ettiremeyecek kadar az olursa, çalışılan test sonucu duyarlı olarak saptanacaktır. Bu durum ise yanlış negatif sonuçlara sebep olmaktadır. Yapılan bir çalışmada dirençli virüs popülasyonunun saptanabilmesi için, klinik numune içerisinde en az %50 oranında bulunması gerektiği gösterilmiştir (99). Ayrıca antiviral ilaca maruziyet süresi, *in vivo* immün sistemin CMV replikasyonu baskılaması gibi sebeplerden dolayı fenotipik testlerde beklenen sonuç ile elde edilen sonuçlar her zaman uyumlu olamamaktadır (100). Yine de tüm bu veriler ışığında fenotipik testlerde antiviral ilaca karşı duyarlılıkta beş kat ve üzerinde bir azalma varsa alternatif tedavi seçeneklerine gidilmesi önerilmektedir (101).

### 2.5.3 Antiviral İlaç Direnç Tespitinde Kullanılan Genotipik Yöntemler

Antiviral ilaç direnci tespitinde kullanılan genotipik testler, ilaç hedefi olan genlerdeki dirençle ilişkili özgül mutasyonların saptanması amacıyla kullanılmaktadır. Genotipik ilaç direnç testleri, özellikle HIV ve hepatit B virüsü başta olmak üzere diğer virüsler için tedavi yönetimine rehberlik etmek amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. Günümüzde immün sistemi baskılanan hasta gruplarının yaygınlaşması ve anti-CMV ilaçlara karşı direncin ortaya çıkmasıyla birlikte, genotipik testler, CMV tedavisinin yönetiminde de kullanım alanı bulmaktadır. Genotipik testler, plazma, BOS, idrar vb. numunelerde yeterli CMV DNA'sı varsa doğrudan klinik örneklerle uygulanabileceği gibi hücre kültüründen elde edilen izolatlara da uygulanabilmektedir. Bu durum genotipik testlerin birkaç saat ile üç gün arasında değişen bir sürede sonuç vermesini sağlamaktadır. Genotipik testlerin

kullanılmasının diğ er bir avantajı, CMV ilaç direncinin yeni mekanizmalarını belirleme potansiyelidir. Bu sayede CMV profilaksi ve tedavisinde yanıt sızlık oluşt ıran yeni mutasyonlar ortaya konabilmektedir. Laboratuvar pratiğ inde kullanılan genotipik testlerle ilgili temel kısıtlılık, ilaç direnci ile ilişkili mutasyonların önceden bilinmesi gerekliliğ idir. İ laç aktivitesi üzerinde etkisi bilinmeyen diğ er mutasyonlar hakkında değ erlendirme yapılamamaktadır. CMV ilaç direncini saptamaya yönelik yapılan genotipik analiz yöntemlerinin bir diğ er sınırlaması ise klinik numune iç erisinde belirli miktardan daha az olan ilaca dirençli viral popülasyonları tespit etme ve niceliklerini belirleme yeteneğ ine sahip olmamalarıdır (4, 25, 72).

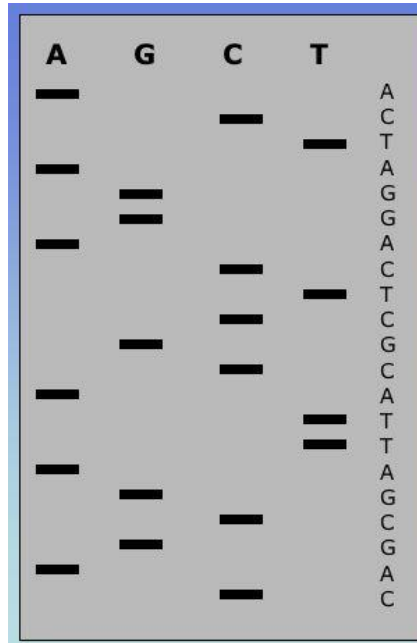
Gansiklovire karş ı geliş en CMV direncini genotipik olarak saptamak iç in *UL97* ve *UL54* genleri PZR ile çoğ altılmaktadır. PZR ürünleri Sanger DNA dizilimi ile analiz edilmekte ve gansiklovir direnci ile ilişkili olduğ u bilinen amino asit mutasyonları tanımlanmakta ve raporlanmaktadır. CMV ilaç direncinin tespiti iç in kullanılan diğ er genotipik yöntemleri arasında PZR ürünlerinin restriksiyon fragman uzunluğ u polimorfizmi (RFLP) ve gerç ek zamanlı PZR yer almaktadır (4, 25, 72).

### ***Sanger-Coulson Zincir Sonlanma Yöntemi***

Frederick Sanger, 1970'li yıllarda DNA'nın baz diziliminin belirlenmesini sağ layan yeni bir teknik geliş tirmiş tir (102). Kendi adıyla geliş tirdiğ i bu yöntem bugün hala çeşitli bilim alanlarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Sanger, PZR sırasında DNA'nın amplifikasyonunda deoksinükleik asitlere ek olarak dideoksinükleik (ddNTP) asitleri birlikte kullanmış tir. Bu ř ekilde ddNTP eklenen DNA zincirinde uzama engellenmiş olmakta ve zincir sonlanmaktadır. Zincir sonlandıran PZR sayesinde, DNA'nın bir bölümünü çoğ altmak yerine, ddNTP'ler kullanılarak boyutları tek bir baz kadar artan bir dizi yeni DNA ürünü elde edilmektedir. Sanger DNA dizileme yönteminin klasik ř eklinde dizinin hangi nükleotit ile sonlandığ ını tespit etmek amacıyla ddNTP'ler radyoaktif olarak iş aretlenmektedir (102, 103). PZR ürünlerini ayırma iş lemi, daha küçük ürünlerin daha büyük ürünlerden daha hızlı göç ettiğ i bir ayırma ř ekli olan poliakrilamid jel üzerinde yapılmaktadır. Bu ayırma iş lemi dört farklı kolon boyunca gerç ekleş tirilmekte ve sonuçta ise bir merdiven gibi baz dizileri elde edilmektedir. Sanger dizileme yönteminin temelleri bugün de aynı

olmakla birlikte zincir sonlandıran PZR ürünlerini ayırma ve tespit etme yöntemleri gelişen teknolojiyle birlikte değişmiştir (103).

Fluoroforların icadından önce Sanger, ddNTP'leri bazın 5' prime ucunda radyoaktif bir etiketle işaretlemiştir. Farklı bazları tanımlayabilecek bir yöntem olmadığından, bir örnek dört ayrı tüpte PZR ile çoğaltılmıştır. Çoğaltılan ürünler ayrı ayrı dört şeride yüklenmiş ve jel boyunca göç etmelerine izin verilmiştir. İşlem tamamlandıktan sonra jel X-ray ile fotoğraflanarak dizi elde edilmiştir (Şekil 2.5) (103).

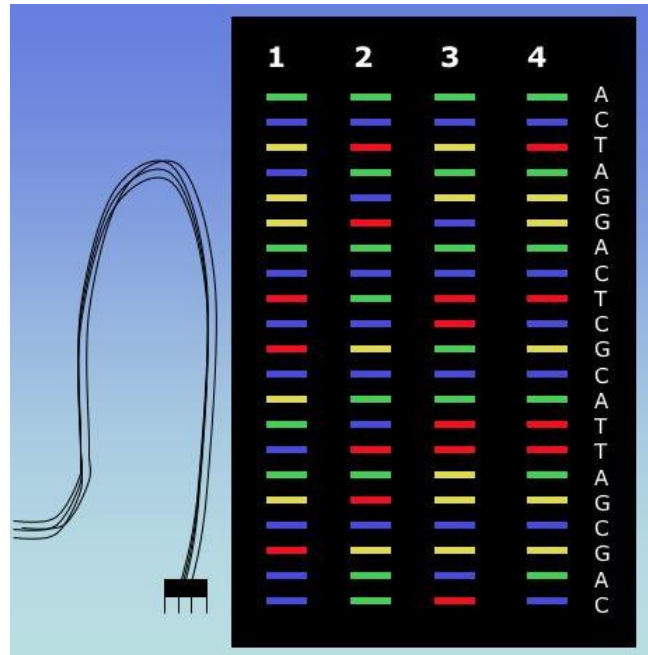


**Şekil 2.5.** Radyoaktif işaretli ddNTP'ler kullanılarak yapılan klasik Sanger dizileme görüntüsü ((103) numaralı kaynaktan Türkçeye tercüme edilmiştir).

Otomatik Sanger dizileme tekniği, floresanla işaretli ddNTP'lerin geliştirilmesiyle birlikte manuel dizileme yönteminin yerini almıştır. Akrilamid jeller hala PZR ürünlerinin ayırma için kullanılmıştır ancak dört bazın tamamı tek bir reaksiyon tüpünde birleştirilip jelle birlikte yüklenmiştir. Çoğaltılmış ürünler plakaların altındaki bölgeye ulaştığında jelde ayırma işlemi bitmiştir. Ardından bir lazer floresan işaretleri uyarmakta ve elde edilen renk kamera ile kaydedilmektedir. Ortaya çıkan görüntüler bilgisayar aracılığıyla analiz edilmektedir (103).

Kapiller sistemlerin 1990'larda geliştirilmesiyle birlikte akrilamid jellerin dökülmesi ihtiyacı ortadan kalkmıştır. Bunun yerine kapiller içine enjekte edilebilen

yarı sıvı polimerler kullanılarak zincir sonlandırıcı PZR ürünlerinin ayrılması sağlanmıştır. Her çalışmadan önce kapiller içerisine bu polimerler doldurulmaktadır. Daha sonra kuyucuklara yüklenen PZR ürünleri elektrik enerjisi ile kapiller boyunca hareket etmektedir. Her bir baz hareketiyle birlikte otomatik cihaz dedektörü ilgili bazda bulunan rengi algılayıp bilgisayar sistemine aktarmaktadır. Sonuçta bu bazların sırayla okunması ile DNA dizisi elde edilmektedir.



**Şekil 2.6.** Floresan boyalar ve kapiller elektroforezin kullanıldığı otomatik Sanger dizileme yöntemi ((103) numaralı kaynaktan Türkçeye tercüme edilmiştir).

Otomatik kapiller dizileme yöntemi, klasik Sanger dizileme yöntemine göre daha hızlı ve daha duyarlıdır. PZR amplifikasyonuna çok daha az kalıp DNA eklenmesi yeterli olmaktadır. Günümüzde otomatik kapiller dizileme cihazları karakteristik olarak tek bir çalışmada 4 ile 96 örneğin dizisini gerçekleştirebilmektedir. Çalışmalar genellikle iki ile üç saat elektroforez gerektirmektedir. Ayrıca otomatik cihazlar sayesinde kontaminasyon ihtimali ve örnek kaybı oranları da azalmıştır. Sanger dizileme yönteminin en önemli kısıtlılığı dirençli virüs popülasyonunun toplam virüs popülasyonu içerisindeki oranının %20 ve altında olduğunda, bu dirençli popülasyonu saptayamamasıdır (72).

### ***Gerçek Zamanlı PZR***

CMV protein kinaz enzimini kodlayan *UL97* geni üzerinde ilaç direnci ile ilişkili mutasyonlarını tanımlamak için erime eğrisi analizi temelli gerçek zamanlı PZR testleri geliştirilmiştir (104). Her mutasyon bölgesine özgü hibridizasyon problemleri farklı floresan boya ile işaretlenmektedir. Mutasyonların neden olduğu erime eğrisindeki değişiklikler PZR ile çoğaltılmasını takiben analiz edilmektedir. Testin avantajları, çok düşük DNA kopya sayılarının hücre kültürü olmadan çoğaltılabilmesi, karışık virüs popülasyonlarının yarı kantitatif olarak analiz edilebilmesi ve farklı boya etiketleri kullanılarak birden fazla mutasyonun aynı anda tespit edilebilmesidir. Dezavantajları ise bilinen mutasyonların yakınındaki polimorfizmlerin erime eğrisini etkileyebilmesi ve mutasyona uğramış her bir kodonu tanımlamak için farklı problemlerin gerekmesidir. Ayrıca test, M460I (ATT/ATA) ve M460V (GTG) gibi aynı kodonda meydana gelen farklı nokta mutasyonlarını ayırt edememektedir (72, 104).

#### **2.5.4 Antiviral İlaç Testlerin Yorumlanması**

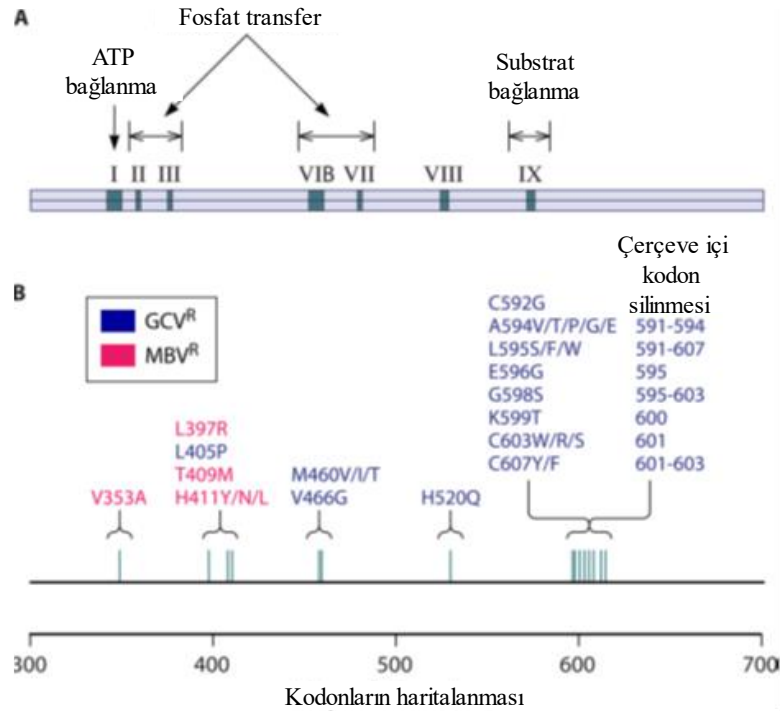
CMV tedavisinde kullanılan ilaçlara yönelik yapılan fenotipik testler referans laboratuvarlarıyla sınırlı kalmaktadır. Bu testlerin yerine genotipik testler daha yaygın kullanılmaktadır. Bu bölümde genotipik testlerin değerlendirilmesi ve saptanan mutasyonların anti-CMV ilaçlara olan etkisi ele alınacaktır.

Genotipik yöntemler içerisinde en çok kullanılan DNA dizileme yöntemidir (72). Bu yöntemle hedef genlerin, direnç ile ilişkili mutasyonları içeren bölgelerinden çoğaltılarak elde edilen PZR ürünlerindeki tüm nükleotit ve amino asit değişiklikleri saptanmaktadır. Elde edilen bu mutasyonlardan bazıları fenotipik olarak test edilmiş olmasına rağmen büyük bir kısmının direnç ile ilişkili fenotipleri belirlenememiştir. Bu durum, dizi analizi sonuçlarının yorumlanmasını zorlaştırmaktadır (72). Bu sorunu aşmak için, çeşitli araştırmacı gruplar tarafından, fenotipik sonucu belli olan mutasyonlar için veri tabanları oluşturulmuş, ancak henüz standartlaştırılmamıştır. Kullanıcı tarafından elde edilen CMV DNA dizileri ve mutasyonlarını, destekleyici fenotipik verilerle birlikte yorumlamak için web tabanlı bir arama aracı geliştirilmiştir (105).

Gansiklovir direncini saptamak için hedeflenen hem *UL97* hem de *UL54* gen bölgelerinde bildirilen varyant kodonlar aşağıdaki genel kategorilerden birine girmektedir: (i) ilaca duyarlı kontrol suşuna transfer edildikten sonra ilaca duyarlı bulunan varyantlar, (ii) bazal veya ilaca duyarlı izolatlarda gözlenen varyantlar, (iii) bazal sekans bilgisi mevcut olmayan, tedavi edilmiş bireylerden elde edilen izolatlarda gözlenen varyantlar, (iv) *in vivo* veya *in vitro* ilaca maruz kaldıktan sonra bilinen bazal sekanstan değişiklik ile ortaya çıkan varyantlar (v) ilaca duyarlı kontrol suşuna transfer edildiğinde ilaç direnci ile ilişkili olan varyantlar (25, 72, 105). İlk kategorideki varyantların antiviral ilaç direncine sebep olmadığı fenotipik yöntemlerle kanıtlanmıştır ve muhtemelen her bir gen içinde doğal olarak oluşan polimorfizmleri ifade etmektedir. Sonraki üç kategoride yer alan varyantlar, ilaca maruz kalma geçmişine ve gen dizisi içindeki konumuna bağlı olarak, sırayla, direnç oluşturma olasılığı düşük olandan yüksek olana olacak şekilde değişen potansiyel direnç mutasyonlarını temsil etmektedir. Son kategori ise, rekombinant belirteç (marker) transfer tekniği ile fenotipik olarak anti-CMV ilaçlardan birine veya daha fazlasına direnç sağladığı kanıtlanmış mutasyonları temsil etmektedir. Klinisyene doğrulanmış direnç mutasyonları olarak sadece bu son kategori bildirilmelidir (4, 72).

### ***Gansiklovir Direnci ile İlişkili UL97 Mutasyonları***

*UL97* gen bölgesinde görülen mutasyonlar sadece gansiklovir ve maribavir direnciyle ilişkili olup, bu iki ilaç dışında CMV tedavisinde kullanılan diğer ilaçlara karşı dirence sebep olmamaktadır. Bu mutasyonların yerlerinin uzun yıllar süren çalışmalar boyunca oldukça sabit kaldığı görülmüştür. Tüm gansiklovir direncinin %80'inden sorumlu olan bu yedi mutasyon M460V/I, H520Q, A594V, L595S, C603W C592G şeklindedir (4, 25, 72, 95, 105). *UL97* geni üzerinde bulunan 590 ve 607 kodon aralığı hem nokta mutasyonlarını hem de kodon silinmelerini (delesyonlarını) içermektedir. Ancak bu iki kodon aralığındaki tüm dizi değişikliklerinin dirençle ilişkili olmadığı da bilinmektedir (örneğin, N597D, K599R, L600I ve D605E) (Şekil 2.7) (72).



**Şekil 2.7.** *UL97* geninin kinaz alt bölgesinin haritası. A) *UL97* kinazın (pUL97) korunmuş işlevsel bölgeleri. B) ispatlanmış mutasyonlar direnç profiline göre renklerle belirtilmiştir. Tek bir kodondaki çoklu mutasyonlar sıklık sırasına göre listelenmiştir. Harita birimleri *UL97* kodonlarına karşılık gelmektedir. ((72) numaralı kaynaktan Türkçeye uyarlanmıştır).

Gansiklovir için EC50'de iki kat ile beş kat artış düşük dereceli, 5 kat ile 15 kat artış orta dereceli ve 15 kattan fazla artış ise yüksek dereceli direnç olarak kabul edilmektedir. Genellikle orta dereceli direnç artışı tek bir *UL97* mutasyonundan kaynaklanmakta iken, yüksek dereceli direnç artışı *UL97* ve *UL54* mutasyonlarının birleşik etkisiyle ortaya çıkmaktadır (4, 25, 72). Gansiklovir direnci ile çeşitli derecelerde ilişkili olduğu bilinen *UL97* gen mutasyonları Tablo 2.2'de özetlenmiştir.

**Tablo 2.2.** UL97 genotipleri ile ilişkili gansiklovir direnci düzeyleri ((25) numaralı kaynaktan Türkçeye tercüme edilmiştir).

Görülme sıklığı	Gansiklovir EC50'de değişim düzeyleri <sup>a</sup>		
	X 5-15	X 2-5	<2X
En sık	M460V/I, H520Q, A594V, L595S, C603W	C592G	
<b>460, 590-607 Kodonlarında daha az</b>	M460T, A594G, 595del <sup>b</sup> , L595F/W, E596Y, 597del2 <sup>b</sup> , 599del, K599T, 600del, 601del, 601del2, C603R, C607Y, del ( $\geq 3$ ) <sup>c</sup>	A591V, A594E/T, E596G, C603S, 596del <sup>b</sup> , 600del2, C607F	E596D, N597D, K599E/R, L600I, T601M, D605E <sup>d</sup>
<b>Atipik noktalar</b>	F342S <sup>e</sup> , K355M <sup>e</sup> , V356G <sup>e</sup> , V466G <sup>e</sup> , C480R <sup>e</sup> , C518Y, P521L <sup>e</sup>	L405P, I610T, A613V	M615V, Y617H, A619V, L634Q, E655K, A674T

<sup>a</sup> Orta düzey direnç (5-15x), düşük düzey direnç (2-5x), önemsiz direnç (<2x)

<sup>b</sup> del=Kodonda çerçeve içi delesyon

<sup>c</sup> 590-607 kodonlar arasında  $\geq 3$  kodonda çerçeve içi silinmesinin orta düzeyde gansiklovir direnci (sekiz kat ila 15 kat) sağladığı varsayılmaktadır. Üçten az kodonun silinmesi, değişen derecelerde gansiklovir direnci sağlayabilir (dört ile on kat)

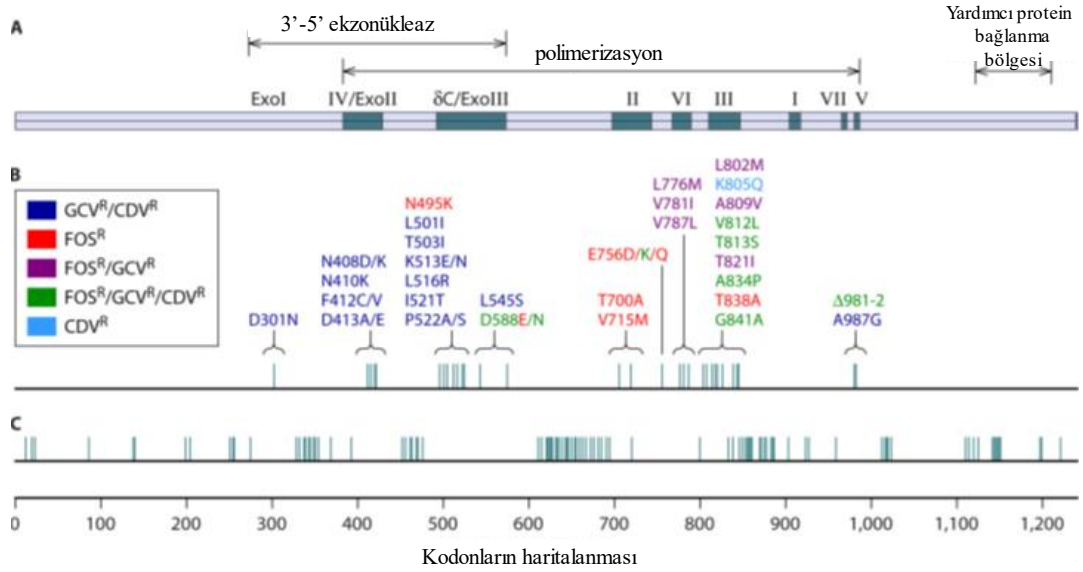
<sup>d</sup> D605E, Doğu Asya'da yaygın olan ve ilaç direnciyle ilgisi olmayan bir temel dizi polimorfizmidir

<sup>e</sup> Maribavir çapraz direnci belgelenmiştir; F342S hariç tümü belirgin şekilde replikasyonu inhibe eder

### ***Gansiklovir Direnciyle İlişkili UL54 CMV DNA Polimeraz Mutasyonları***

UL54 geninde görülen bazal nükleotit dizilimi UL97 genine göre daha değişkendir ve gözlemlenen direnç mutasyonlarının sayısı daha fazladır. Bununla birlikte, UL54 genindeki direnç mutasyonları, klinik izolatlarda UL97'deki mutasyonlardan çok daha az sıklıkla tespit edilmektedir. P522S, V781I, L802M, A809V, A834P ve A987G gibi bazı mutasyonlar birden fazla klinik izolatta rapor edilmiştir. UL97'den farklı olarak, DNA polimeraz mutasyonlarının sürekli olarak meydana geldiği iyi tanımlanmış kodonlar veya kodon aralıkları bulunmamaktadır (Şekil 2.8) (4, 25, 72, 95).





**Şekil 2.8.** CMV DNA polimeraz (*UL54*) geninin haritalanması. A) CMV DNA polimerazın fonksiyonel bölgeleri. B) Direnç profiline göre renklendirilmiş onaylı mutasyonlar. C) İlaça duyarlı izolatlarda gözlenen polimorfizmler. ((72) numaralı kaynaktan Türkçeye uyarlanmıştır).

*UL54* geninde bulunan korunmuş bölgeler içinde, aynı veya bitişik kodonlardaki mutasyonlar farklı fenotiplere sahip olabilmektedir. Örneğin, L516R ve P522S/A mutasyonları direnç kazandırırken, D515G ve P522L mutasyonları direnç kazandırmamaktadır. N495K mutasyonu sadece foskarnet direncine sebep olurken, yakınındaki L501I mutasyonu sadece gansiklovir ve sidofovir direnci sağlamaktadır (106, 107). Dolayısıyla, *UL97*'de olduğu gibi, direnç ile ilişkili olduğu kanıtlanmış mutasyonlara yakın olan varyant kodonların da direnç sağladığı veya benzer antiviral fenotipe sahip olduğu varsayılamaz. Sadece fenotipik bir yöntemle dirence sebep olduğu doğrulanmış olan mutasyonlar rapor edilmelidir (4, 25, 72, 95).

### ***Direnç İlişkisi Bilinmeyen Polimorfizmler***

Mevcut literatür incelendiğinde, hiç antiviral tedavi almamış hastalardan elde edilen bazal CMV izolatlarında *UL97* ve *UL54* genlerinde meydana gelen bazı sekans değişikliklerinin olduğu bilinmektedir (108, 109). Bu sekans farklılıkları ilaç direnci ile ilişkisi olmayan, temel türler arası dizi polimorfizmi örnekleri olarak düşünülmektedir (108). Bu görüşün aksine, *UL97* geninde saptanan H469Y, N510S ve

D605E gibi bazal polimorfizm değişikliklerin rekombinant fenotipik yöntemle ilaca duyarlı olduklarının kesin olarak doğrulanması gerektiği belirtilmektedir (110).

Hem *UL97* hem de *UL54* genlerinde *in vitro* veya *in vivo* olarak ilaca maruz kaldıktan sonra, bilinen bir bazal diziden değişiklik göstererek ilaç direnciyle ilişkili olabilecek bir mutasyon da ortaya çıkabilmektedir. Bu ilişkinin doğrulanması için fenotipik direnç testleri ile ortaya çıkan bu mutasyonun değerlendirilmesi gerekmektedir (72). İlaç maruziyetinden sonra saptanan bu mutasyonların fenotipik yöntemlerle doğrulanmamış olması genotipik yöntemlerle antiviral direnç çalışan laboratuvarların sonuç vermesini zorlaştırmaktadır. Güncel literatürde 20'den fazla *UL97* ve 150'den fazla *UL54* dizi değişikliğinin bu kategoriye girdiği bilinmektedir (72, 111). Bu tedavi sürecinde ortaya çıkan mutasyonların, virüste ilaç direncine sebep olmasa bile, direnç ilişkili mutasyonlarda virüsün zayıflayan uyum yeteneğine karşı telafi edici etkisi olduğu düşünölmektedir. Örneğin, CMV DNA polimeraz geninde K805Q aminoasit değişikliği, foskarnete karşı yüksek düzeyde dirençle ilişkili olan T821I mutasyonunun virüs replikasyonu üzerine olan olumsuz etkisini telafi etmektedir (4, 112).

Tüm bu bilgiler ışığında; fenotipik olarak karakterize edilmemiş dizi varyantlarının, dizileme kalite kontrolü yapılmadan, ardışık numunelerdeki dizi değişikliklerinin takibi olmadan, tedavi geçmişı dikkate alınmadan ve bilinen gen mutasyonlarına yakınlığı gibi faktörler dikkatli bir şekilde analiz edilmeden dirençle ilişkili olduğu varsayılmamalıdır (25).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Hastaların Seçimi

Bu çalışma, Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurul tarafından onaylanmasının (Proje no: GO 22/264, Karar no: 2022/05-17) ardından Mart 2022 ile Mart 2023 tarihleri arasında yapılmış ve Hacettepe Üniversitesi erişkin, çocuk ve onkoloji hastanelerinde tedavi gören, immün yetmezliği bulunan ve CMV DNA yükü 1000 IU/ml ve üzerinde olan hastalar dahil edilmiştir. Bu proje, Hacettepe Hastaneleri Merkez Laboratuvar Moleküler Mikrobiyoloji birimi ile Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Viroloji Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

CMV enfeksiyonlarının tanısı ve tedavisi için CMV DNA yükü, Merkez Laboratuvar Moleküler Mikrobiyoloji biriminde kantitatif olarak IU/ml biriminde sonuçlandırılmaktadır. Bu rutin tanı amacıyla, ilk olarak hastalardan elde edilen plazmaların Merkez Laboratuvar Moleküler Mikrobiyoloji bölümünde kabulü yapılmakta ve işleme alınana kadar -20° C'de saklanmaktadır. Hedeflenen hasta sayısına ulaşıldıktan sonra tam otomatize izolasyon cihazlarında (Abbott m2000sp, Abbott Park, Illinois, U.S.A.) CMV DNA elde edilmekte ve gerçek zamanlı kantitatif PZR cihazlarından (Abbott m2000rt, Abbott Park, Illinois, U.S.A.) gelen sonuçlar yorumlanarak raporlanmaktadır. Bu işlemlerin tamamı üretici firma önerileri doğrultusunda gerçekleştirilmektedir. Güncel literatürde direnç yönünden anlamlı virüs yükü 1000 IU/ml olarak kabul edilmekte olduğundan (95), bu sonuçlardan plazma CMV DNA yükü 1000 IU/ml ve üzerinde olan ve aynı zamanda immün yetmezliği de bulunan hastalar belirlenip Moleküler Mikrobiyoloji laboratuvarına gelen plazma örnekleri prospektif olarak toplanmıştır. Yukarıda belirtilen tarih aralığında, 142 hastaya ait 364 plazma numunesi toplanmıştır. Toplanan hasta plazmaları işleme alınana kadar Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda -20° C'de muhafaza edilmiştir. Her bir hastadan bir plazma numunesi dahil edilecek şekilde 142 plazma ileri işleme alınmıştır. Bu şartları sağlayan tüm katılımcılardan yazılı aydınlatılmış onam alınmıştır (EK 1 ve 2). Hastaların tanıları, tedavi ve takip prosedürleri hasta dosyalarından temin edilmiştir. Virüs yükü 1000 IU/ml ve üzerinde olsa bile herhangi bir immün yetmezliği olmayan, plazma CMV DNA yükü 1000

IU/ml altında olan ve çalışmaya katılmayı reddeden hastalar ise çalışmaya dahil edilmemiştir.

Plazma toplama süreci tamamlandıktan sonra sırayla, plazmadan CMV DNA izolasyonu, CMV *UL97* gen bölgesinde antiviral direncin değerlendirilmesinde kullanılan bölgeyi amplifiye edebilen spesifik primerlerin tasarlanması, PZR optimizasyonu, PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezinde görüntülenmesi, hedef DNA bölgesinin dizilenmesi, verilerin analizi ve mutasyon analizi işlemleri gerçekleştirilmiştir.

### 3.2. Plazmadan Virüs DNA İzolasyonu

Çalışmaya dahil edilen tüm hasta plazmaları WizPrep™ Viral DNA/RNA Mini Kit (V2) (Jungwon-gu, Güney Kore) manuel izolasyon kiti kullanılarak üretici önerileri doğrultusunda izolasyon işlemine alınmıştır. Kit silika-membran teknolojisini kullanmaktadır ve kullanıma hazır olacak şekilde temin edilmiştir. Her bir plazma numunesinin izolasyonu yaklaşık 20 dakika sürmektedir. Kit içeriği; VL2 tampon, W1 tampon, W2 tampon, RNase içermeyen su, spin kolon ve 2 ml toplama tüpleri şeklindedir. Üretici önerileri doğrultusunda, 288 ml %96'lık moleküler kullanıma uygun etanol W2 tamponuna eklenmiştir.

Üretici önerilerine uygun olacak şekilde viral DNA izolasyon prosedürü aşağıda maddeler halinde özetlenmiştir:

- i. 100µl hasta plazması 1,5 ml mikrosantrifüj tüpüne eklenmiştir.
- ii. Plazmanın üzerine 350µl VL2 tamponu eklenmiş ve çalkalayıcı yardımıyla karıştırılmıştır.
- iii. Plazma ve VL2 tamponu 10 dakika oda ısısında inkübe edilmiştir. İnkübasyon boyunca tüpler en az bir kere alt üst edilerek karışması sağlanmıştır.
- iv. Bu karışım üzerine 350µl %70 etanol eklenmiş ve karışması sağlanmıştır.
- v. Numune-VL2 tampon ve alkol karışımı spin kolon içerisine alınıp dakikada 13000 tur (rpm) olacak şekilde 1 dakika boyunca santrifüj edilmiştir.

- vi. Altta kalan solüsyon atılmıştır. Spin kolona 700µl W1 Tamponu eklenmiş ve 13.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
- vii. Altta kalan solüsyon atılmıştır. Spin kolonuna 500µl W2 Tamponu eklenmiş ve 13.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Bu işlem bir kez daha tekrar edilmiştir.
- viii. Altta kalan solüsyon atılmış ve spin kolon boş olacak şekilde 13.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilmiştir.
- ix. Spin kolon yeni 1,5 ml toplama tüpüne alınmıştır. 40µl RNaz içermeyen su eklenmiş ve oda ısısında 5 dakika inkübe edilmiştir.
- x. İnkübasyonun ardından 13.000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapılmıştır. Spin kolon atılmış ve saflaştırılmış viral DNA, PZR işlemi için kalıp DNA olarak kullanıma hazır hale gelmiştir.

Bu yönergeye uygun olacak şekilde 142 hasta plazmasının izolasyonu tamamlanıp Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda PZR işlemine kadar -80° C'de muhafaza edilmiştir.

### 3.3. Primerlerin Tasarlanması

CMV'de gansiklovir direncinden %95 oranında *UL97* gen bölgesi sorumludur (71). Özellikle 300. ile 700. kodonlar arası protein kinaz enziminin ATP ve substrat bağlayan alt bölümlerini içermesinden dolayı tüm gansiklovir direncinin %80'i bu kodonlar arasında görülen mutasyonlardan kaynaklanmaktadır (bakınız şekil 2.8) (25). Tüm bu sebeplerden dolayı gansiklovir direncini yüksek oranda saptayabilmek amacıyla PZR için primer tasarımı aşamasında CMV *UL97* gen bölgesinin 357 ile 645 kodonları arasında kalan ve 863 baz çifti içeren kısmı hedeflenmiştir.

Güncel literatür dikkate alındığında doğrudan plazmadan genotipik yöntemlerle CMV direnç testi çalışılabilmesi için nested (yuvalanmış) PZR önerilmektedir (113, 114). Bu çalışmada da yuvalanmış PZR yöntemi uygulanmıştır ve ilk olarak iç primerlerin tasarlanması için hedef bölgeyi içine alacak şekilde veri seti oluşturulmuştur. Veri setlerini oluşturma ve hizalama aşamalarında moleküler değerlendirme ve genetik analiz (MEGA) (V11) programı kullanılmıştır (115). Veri setleri, *GenBank*® veri tabanında bulunan diziler ile oluşturulmuştur (116). Veri tabanından nükleotid dizisi araştırırken ülkemizden veri tabanına yüklenmiş CMV

*UL97* gen bölgesini içeren hiçbir veriye rastlanmamıştır. Bu sebepten dizi çeşitliliğini sağlamak amacıyla öncelikle sınır ülkemiz olan İran'dan beş böbrek nakil alıcısı hasta ve üç HKHN alıcısı hasta dahil edilmiştir. Yine ülkemiz gibi Akdeniz ülkeleri olan İtalya ve Fransa'dan 12 çocuk hastanın kanından direkt saptanan *UL97* gen dizisi eklenmiştir. Virüsün genetik çeşitliliğini artırmak amacıyla Hindistan ve Japonya gibi Doğu Asya ülkelerinden, Amerika Birleşik Devletleri'nden ve Brezilya'dan çeşitli immün yetmezlikleri olan hastalardan direkt elde edilen nükleotid dizileri de kullanılmıştır. Veri seti toplamda 152 hastadan elde edilen viral *UL97* geninden oluşturulmuş ve MEGA (V11) programı kullanılarak tüm diziler hizalanmıştır. Bu hizalanan diziler üzerinde, hedeflenen bölgeyi de içerecek şekilde, en çok korunmuş alanlardan iç primerler seçilmiştir. Aynı yöntem takip edilerek dış primerlerin tasarlanması da tamamlanmıştır. Dış primerlerin tasarımı aşamasında, duyarlılığı artırmak amacıyla anlamlı primer dizisinin 7. pozisyonunda 'Y' dejenere nükleotidi kullanılmıştır. İç ve dış primerlerin dizilimi ve özellikleri sırayla Tablo 3.1 ve Tablo 3.2'de gösterilmiştir.

**Tablo 3.1.** İç primer dizileri ve özellikleri

Primer Adı	Polarite	Dizi	Pozisyon	Uzunluk
CMV UL97-İç-F	Anlamlı dizi	CGTAAGCACAGCGAGACG	1072-1090	18 baz
CMV UL97-İç-R	Tamamlayıcı dizi	GCGACACGAGGACATCTT	1935-1953	18 baz

**Tablo 3.2.** Dış primer dizileri ve özellikleri

Primer Adı	Polarite	Dizi	Pozisyon	Uzunluk
CMV UL97- Dış-F	Anlamlı dizi	CTATCGYGTGGTCAAGGTG	1050- 1069	19 baz
CMV UL97- Dış-R	Tamamlayıcı dizi	TATTCGTGCAGCATGGTCTG	1991- 2011	20 baz

Primer tasarımı tamamlandıktan sonra, primer sentezleri ticari firma tarafından gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen primer dizilerinin sulandırılması aşağıda anlatıldığı şekilde yapılmıştır.

#### ***Primerlerin sulandırılması ve primer stoklarının hazırlanması***

Üretici firmadan liyofilize halde alınan primerlerin PZR aşamasında kullanılabilmesi için üretici firmanın önerisi doğrultusunda steril ve iyonlarından arındırılmış su ile çözünmesi gerekmektedir. Bu aşamada, iç anlamlı primer dizi seti 663 µl su ile çözünerek 100 mikromolar (µM) stok primer solüsyonu hazırlanmıştır. Benzer şekilde iç tamamlayıcı primer dizisi de 1143 µl su ile çözülerek 100 µM primer stoğu hazırlanmıştır. Dış anlamlı primer dizi seti ve dış tamamlayıcı primer seti sırayla 519 µl ve 733 µl su ile çözünerek 100 µM stok dış primer solüsyonları hazırlanmıştır. Her bir stok primer solüsyonundan 1/10 oranında saf steril su ile dilüsyon yapılarak PZR için kullanıma hazır 10 µM primerler elde edilmiştir.

#### **3.4. PZR Optimizasyonu**

Yukarıda belirttiği üzere hedef bölgenin PZR ile çoğaltılması için kalıp virüs DNA'sı ve primer dizileri kullanım için hazır hale getirilmiştir. PZR için gerekli olan diğer içerikler ise Taq polimeraz enzimi, enzim tamponu, MgCl<sub>2</sub>, deoksinükleotidler (dNTPs) ve su şeklindedir. Bu çalışmada, su hariç diğer içeriklerin kullanıma hazır olduğu FIREPol® 5x (Solis Bio Dyne, Estonya) reaksiyon karışımı kullanılmıştır. Bu karışımın içeriği, FIREPol® DNA polimeraz, 5x reaksiyon tamponu, 12.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM dNTPs (her birinden 1 mM) ve PZR ürünlerini agaroz jele yüklemek için mavi ve sarı renkli yükleme boyalarından oluşmaktadır. Polimeraz zincir reaksiyonunun gerçekleşmesi için gerekli olan tüm içerikler tamamlandıktan sonra birinci ve ikinci tur yuvalanmış PZR deneylerine geçilmiştir.

Birinci ve ikinci tur PZR için kullanılan deney içerikleri sırayla Tablo 3.3'te ve Tablo 3.4'te gösterilmiştir. Hem birinci hem de ikinci tur PZR ısı döngü protokolleri birbiri ile aynı ve Tablo 3.5'te gösterildiği şekildedir.

**Tablo 3.3.** Birinci tur PZR karışım içeriği ve son konsantrasyonlar

	<b>Son konsantrasyon</b>	<b>Hacim (µl)</b>
FIREPol® 5x kullanıma hazır karışım	1x	4
CMV UL97-Dış-F (10 µM)	0,2 µM	1
CMV UL97-Dış-R (10 µM)	0,2 µM	1
Kalıp DNA	Değişken	5
Su		9
<b>Toplam</b>		20

Tüm PZR hazırlık işlemleri biyogüvenlik düzey 2 (BGD-2) kabinlerde yapılmıştır. İlk olarak 1,5 ml steril tüp içerisine, her bir reaksiyon tüpü için, önce 9 µl su konulmuştur. Suyun üzerine 4 µl FIREPol® 5x kullanıma hazır karışım ve 1 µl olacak şekilde CMV UL97-Dış-F ve CMV UL97-Dış-R primerlerinden eklenmiştir. Hazırlanan bu karışım her bir reaksiyon tüpüne 15 µl olacak şekilde dağıtılmıştır. Karışımları dağıtma işlemi dahil tüm basamaklar soğuk blok üzerinde yapılmıştır. Tüpler sıkıca kapatılıp hastalardan izole edilen kalıp DNA'ları eklemek için ikinci BGD-2 olan kabine geçilmiştir. Ardından her bir karışım üzerine 5 µl kalıp DNA eklenmiş ve tüpler kapatılmıştır. Sonuçta deney hacmi 20 µl olmuştur. Tablo 3.5'te belirtilen ısı döngü protokolü Techne TC-3000G (Keison Products, İngiltere) ısı döngü cihazında uygulanmıştır. Tüm deneylerde kontaminasyon kontrolü için negatif kontrol ve reaksiyon kontrolü için pozitif kontrol tüpleri test edilmiştir.

**Tablo 3.4.** İkinci tur PZR karışım içeriği ve son konsantrasyonlar

	<b>Son konsantrasyon</b>	<b>Hacim (µl)</b>
FIREPol® 5x kullanıma hazır karışım	1x	4
CMV UL97-İç-F (10 µM)	0,2 µM	1
CMV UL97-İç-R (10 µM)	0,2 µM	1
1. tur PZR ürünü	Değişken	5
Su		9
<b>Toplam</b>		20



Birinci tur PZR ısı döngü protokolü yaklaşık 120 dakikada sürmektedir. Ardından ikinci tur polimeraz zincir reaksiyonuna geçilmiştir. Reaksiyon içeriği hazırlanırken birinci turda anlatılan protokolden fark, kalıp DNA ve CMV UL97-İç-F ve CMV UL97-İç-R primerlerin kullanılmış olmasından kaynaklanmaktadır. Kalıp DNA olarak ise birinci tur PZR ürününden 5 µl alınarak reaksiyon tüpüne eklenmiştir (bakınız Tablo 3.4). Reaksiyon karışımı hazırlandıktan sonra birinci turun ısı döngü protokolünün aynısı uygulanmıştır. Sonuçta hedeflenen gen bölgesine ait ürünler elde edilmiş ve ürünlerin agaroz jel elektroforezinde görüntüleme aşamasına geçilmiştir. Görüntüleme sonuçları baz alınarak yuvalanmış PZR deneyleri için duyarlılık çalışması yapılmıştır.

**Tablo 3.5.** PZR ısı döngü protokolü

<b>Ön denatürasyon</b>	94 °C	5 dk	
<b>Denatürasyon</b>	94 °C	30 sn	30 döngü
<b>Bağlanma</b>	54 °C	1 dk	
<b>Uzama</b>	72 °C	1 dk	
<b>Son uzama</b>	72 °C	5 dk	
<b>Bekleme</b>	4 °C	Sonsuz	

### 3.5. PZR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezinde Görüntülenmesi

Her bir deneyin ardından sonuçların değerlendirilmesi amacıyla PZR ürünleri %1,5 agaroz jelde görüntülenmiştir. Görüntüleme sırasında gereken agar, Tris-Borik asit-EDTA (TBE) tamponu ve çift zincirli DNA'nın jel içerisinde görünmesini sağlayan SafeView™ (Applied Biyolojik Ürünleri, Kanada) malzemeleri ticari olarak temin edilmiştir. Elektroforez tankı, güç kaynağı ve görüntüleme sistemleri Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Moleküler Laboratuvarı'ndan sağlanmıştır. Ürünlerin görüntülenmesi aşağıda maddeler halinde özetlenmiştir:

- i. 100 ml % 1,5 agaroz solüsyonu hazırlamak için 100 ml 1x Tris-Borik asit-EDTA (TBE) tamponu içerisine 1,5 gram (gr) agar ilave edilmiş ve kaynatılmıştır.

- ii. Agaroz, çözelti haline geldikten sonra 5 µl SafeView™ klasik (Applied Biyolojik Ürünleri, Kanada) eklenmiş ve iyice karıştırılmıştır.
- iii. Agaroz çözeltisi tarak yerleştirildikten sonra jel tepsisine boşaltılmış ve 15 dk donması beklenmiştir.
- iv. Agaroz çözeltisi donduktan sonra tarak çıkarılmıştır. Jel elektroforez tepsi haznesine yerleştirilmiş ve elektroforez yürütme tankı 500 ml 1x TBE elektroforez tamponu ile doldurulmuştur.
- v. PZR ürünleri yüklemeye hazır boyalar içerdiği için doğrudan 5 µl hacimde jel içerisindeki kuyucuklara yüklenmiştir.
- vi. Her bir görüntüleme çalışmasında ilk ve son kuyucuklara 100 baz çifti aralıklarla artan DNA ladder yüklenmiştir.
- vii. Örnekler 120 volt ve 30 amper altında 40 dk boyunca yürütülmüştür.
- viii. Sonuçlar jel görüntüleme sisteminde analiz edilmiştir (UVP BioSpectrum Multispectral Imaging System, ABD).

Hasta plazmalarından elde edilen tüm kalıp virüs DNA izolatlarına yukarıda anlatıldığı gibi önce PZR ile hedef çoğaltma ve ardından agaroz jelde görüntüleme işlemleri uygulanmıştır. Görüntüleme işlemleri sonucunda 142 hasta örneğinin 77'sinde hedeflenen bölgede ampikon saptanmış ve dizi analizi işlemine kadar -20 °C muhafaza edilmiştir. Hedef bölge bandı saptanmayan PZR ürünleri tıbbi atık prosedürlerine uygun olarak atılmış ve ilgili hastaya ait deneyler tekrar edilmiştir.

### **3.6. PZR Ürünlerinin Dizi Analizlerinin Yapılması**

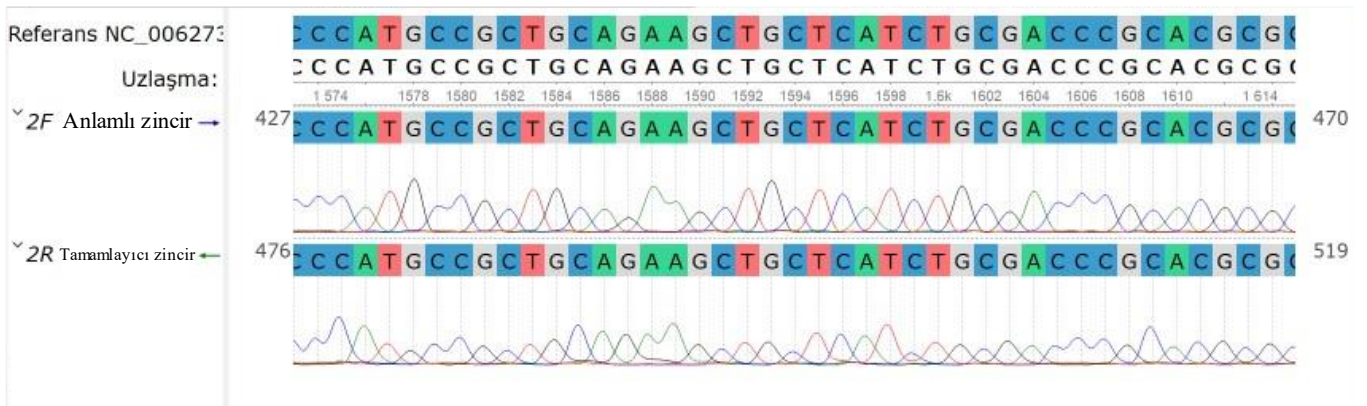
Bu çalışmada, PZR sonucu elde edilen ürünlerin dizi analizleri Sanger yöntemi ile hizmet alımı şeklinde gerçekleştirilmiştir. Dizileme aşamasında ilk olarak ürünler tekrar agaroz jelde yürütülmüş ve ultraviyole altında jelden kesilerek dizileme öncesi saflaştırma işlemine alınmıştır. Ardından ddNTP'lerin kullanıldığı dizileme PZR gerçekleştirilmiştir. Bu reaksiyonun ardından elde edilen farklı uzunluktaki ürünler Sephadex ® ile jel filtreleme metodu kullanılarak saflaştırılmıştır. Saflaştırılan bu ürünler, tam otomatik kapiller elektroforez dizileme cihazı ile dizilenmiş ve elektroferogram dalgaları elde edilmiştir.

### 3.7. DNA Dizi Verilerinin Analizi

DNA dizi analizleri tamamlandıktan sonra elde edilen elektroferogramların analiz edilerek nükleotid dizilerine dönüştürülmesi aşamasına gelinmiştir. Bu aşamada ilk olarak elde edilen elektroferogram dalgalarının hedeflenen *UL97* gen bölgesine ait olduğunu değerlendirmek için MEGA (v11) yazılımı kullanılarak Temel Yerel Uyum Arama Aracı (BLAST) üzerinden tarama yapılmıştır (115). Taramalar sonucunda tüm dizilerin hedeflenen gen bölgesine ait olduğu saptanmıştır.

Elde edilen dizilerin hedef bölgeye ait olduğu görüldükten sonra analiz işlemine geçilmiştir. Bu analiz işleminde Unipro UGENE™ (v46) yazılım programı kullanılmıştır (117).

Analiz aşamasında her bir hastaya ait olan anlamlı ve tamamlayıcı zincirler ve bu zincirlerin ortaya çıkmasını sağlayan elektroferogram dalgaları program yardımıyla hizalanmıştır. Hizalama işleminde Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi'nden (NCBI) edinilen *NC\_006273.2:141798-143921* suşuna ait *UL97* gen dizisi referans olarak kullanılmıştır. Anlamlı ve tamamlayıcı dizilerin birlikte değerlendirilmesi sonucunda ortak bir uzlaşma dizisi elde edilmiştir. Referans dizi, anlamlı, tamamlayıcı ve uzlaşma dizilerinin değerlendirildiği bir örnek Şekil 3.1'de gösterilmiştir (117).



**Şekil 3.1.** Referans dizi, anlamlı dizi, tamamlayıcı dizi ve elde edilen uzlaşma dizilerinin değerlendirildiği bir hasta örneği (Unipro UGENE™ (v46))

Tüm hastalar için bu analiz işlemi yapılmış ve her hastada saptanan CMV hedef bölgesine ait uzlaşma dizileri elde edilmiştir. Bu aşamadan sonra çalışmanın son aşaması olan mutasyon analizine geçilmiştir.

### 3.8. Mutasyon Analizi

Her bir hastadan elde edilen hedef bölgeye ait uzlaşma dizileri, *UL97* gen bölgesinde meydana gelen mutasyonlar sonucunda ortaya çıkan gansiklovir direnci açısından değerlendirilmiştir. Bu işlem için daha önce çeşitli virüslerde görülen ilaç direncini genotipik olarak saptayan bir mutasyon direnç analiz platformu olan “Mutation Resistance Analyzer (MRA)” üzerinden yapılmıştır (105, 118). Bu platform haftada bir literatür taraması yapmakta ve tanımlanan yeni bir mutasyon varsa platforma yüklenmektedir. Platformun en son içerik güncellemesi 17 Ekim 2022 tarihinde yapılmıştır (118).

Analiz edilen uzlaşma dizisinde eğer mutasyon varsa, ilaç direnci ile ilişkili mutasyon, genetik polimorfizmle ilişkili mutasyon, fenotipi belirsiz mutasyon ve veri tabanında olmayan mutasyon şeklinde sınıflandırılmaktadır.

### 3.9. İstatiksel Analiz

Verilerin analizinde IBM® SPSS® Statistics 28.0.1 paket programı kullanılmıştır. Sayısal değerler normal dağılıma uymadığı için ortanca ve çeyrekler arası genişlik değerleri verilmiştir. Tedaviye yanıtı olmayan ve olmayan iki grup arasında sayısal değişkenler karşılaştırılırken, Fisher exact ki-kare testi kullanılmış, kategorik değişkenler için Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. İstatistik anlamlılık seviyesi  $p < 0,05$  olarak kabul edilmiştir.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Hastaların Genel Özellikleri

Bu çalışmaya, dahil olma kriterlerini sağlayan 142 hasta alınmıştır. Katılımcıların 89'u (%62,7) erkek, 53'ü (%37,3) kadındır. Hastaların yaşı en küçük 0 iken, en büyük 81 ve ortanca yaş 37'dir. Çocuk hasta sayısı 47 (%61), erişkin hasta sayısı 95'tir (%39). Çalışmaya dahil edilen hastaların 54'ü kemik iliği transplantasyon (HKHN) ünitesi (%38,0), 15'i organ nakil ünitesi (%10,5), 28'i çocuk ve erişkin hematoloji bölümü (%19,7), 12'si çocuk immünoloji bölümü (%8,4), 8'i çocuk enfeksiyon hastalıkları bölümü (%5,6), 4'ü erişkin enfeksiyon hastalıkları bölümü (%2,8) ve 21'i ise diğer bölümlerde (genel dahiliye, romatoloji, onkoloji) (%14,7) takip edilen hastalardan oluşmaktadır. Hastaların tedavi edilen bölümlere göre dağılım sayısı ve yüzde oranları Tablo 4.1'te gösterilmiştir.

**Tablo 4.1.** Hastaların tedavi edilen bölümlere göre dağılımı ve yüzde oranları

Bölüm Adı	Hasta Sayısı (n)	Yüzde (%)
Kemik iliği transplantasyon ünitesi	54	38,0
Çocuk-erişkin hematoloji bölümü	28	19,7
Diğer bölümler (Genel Dahiliye, Romatoloji, Onkoloji)	21	14,7
Organ nakil ünitesi	15	10,5
Çocuk immünoloji bölümü	12	8,4
Çocuk enfeksiyon hastalıkları	8	5,6
Erişkin enfeksiyon hastalıkları	4	2,8
<b>Toplam</b>	142	100

Deneyler sonucunda 142 hastanın 77'sinde mutasyon analizi yapılabildiği için verilerin değerlendirilmesi 77 hasta üzerinden yapılmıştır. Hastaları gruplara ayırmadan yapılan değerlendirmede iki hastada akciğer tutulumu (%2,6), iki hastada GIS tutulumu (%2,6) ve üç hastada retina tutulumu (%3,9) olduğu görülmüştür.

Hastaların olası organ tutulumları ele alındığında ise yedi hastada akciğer (%9,1), iki hastada GIS (%2,6) ve iki hastada ise olası SSS enfeksiyonuna (%2,6) rastlanmıştır. Hastaların 63'ünde (%81,8) ise herhangi bir kesin veya olası CMV hastalığı odağı düşünülmemiştir. Hastalara ait kesin ve olası organ tutulumlarının sıklık ve yüzde dağılımları sırayla Tablo 4.2 ve Tablo 4.3'te ele alınmıştır.

**Tablo 4.2.** CMV organ tutulumlarının sıklık ve yüzde dağılımı

CMV Hastalığı	Hasta (n)	Yüzde (%)
Retinit	3	3,9
CMV pnömonisi	2	2,6
CMV gastrointestinal sistem hastalığı	2	2,6

**Tablo 4.3.** Olası CMV organ tutulumlarının sıklık ve yüzde dağılımları

Olası odak	Hasta (n)	Yüzde (%)
Kesin veya olası odak yok	63	81,8
Akciğer	7	9,1
GIS	2	2,6
SSS	2	2,6

GIS: Gastrointestinal sistem, SSS: Santral sinir sistemi

Tüm hastalar değerlendirmeye alındığında tedavi başlanan hasta sayısının 61 (%79,2) olduğu görülmüştür. Bu hastalardan 52'si (52/61) CMV viremi için tedavi alırken 9 hasta ise kesin ya da olası CMV hastalığı tanısına yönelik tedavi almıştır. Elli altı hastanın tedavisinde gansiklovir kullanılmıştır. Gansiklovir tedavi süresi en az üç gün en uzun 180 gün ve ortanca 21 gün olarak saptanmıştır. Valgansiklovir tedavisi ise 14 hastaya, en kısa 10 gün, en uzun 385 gün ve ortanca 41 gün olacak şekilde uygulanmıştır. Üç hastanın tedavisinde foskarnet kullanılmıştır. Foskarnet kullanım süresi en kısa altı gün, en uzun 42 gün ve ortanca 12 gün olmuştur. Çalışmaya dahil edilen sadece iki hastaya sidofovir tedavisi verilmiş olup bu tedaviler iki doz ve üç doz şeklinde uygulanmıştır.

Hastaların tanı anında viral yük ortanca 7687 IU/ml, en az 1100 IU/ml ve en yüksek 2107745 IU/ml olarak bulunmuştur. Hastaların takiplerinde en yüksek viral

yükün ortanca 25203 IU/ml (en az 1000 IU/ml- en yüksek 100000000 IU/ml) olduğu görülmüştür. 46 hasta serumunda anti-CMV IgM araştırılmış ve 4 (4/46) hastada pozitif bulunmuştur. Benzer şekilde 46 hastada anti-CMV IgG varlığı değerlendirilmiş ve 44 (44/46) hastada pozitif olduğu görülmüştür. Hastaların CMV enfeksiyonu tanısından sonraki ölüm hızlarına bakılacak olursa ilk 30 gün içinde 13 (13/77), ilk 60 gün içinde ise 22 (22/77) hastanın hayatını kaybettiği görülmüştür.

Hastaların tedaviye yanıt durumları incelendiğinde, sekiz (8/77) hastanın etkin tedaviye yanıtızsız, iki (2/77) hastanın olası yanıtızsız, 51 (51/77) hastanın ise tedaviye yanıtlı olduğu anlaşılmıştır. Hastanın vefat etmesi, kendi isteği ile tedavi takibinden çıkması, tedavi takibi için gereken kontrol plazma numunesinin alınmamış olması gibi sebeplerden dolayı tedavi yanıtının değerlendirilmesi süreci 16 (16/77) hastaya uygulanamamıştır.

Hastalar aynı zamanda altta yatan immün yetmezlik sebebine göre güncel literatüre uygun olarak gruplar halinde incelenmiştir. Bu hasta grupları, HKHN alıcıları, solid organ transplantasyonu (SOT) yapılan hastalar, HIV ile yaşayan bireyler, konjenital CMV enfeksiyonu ile doğan bebekler, hematolojik hastalığı olan kişiler ve bu hastalık gruplarına dahil olmayan diğer hastalar şeklindedir (8, 25, 50, 59). Bu gruplarda bulunan hasta sayıları ve yüzde oranları Tablo 4.4'te ifade edilmiştir.

**Tablo 4.4.** Hastaların immün yetmezlik sebebine göre sıklık ve yüzdeleri

<b>İmmün yetmezlik sebebi</b>	<b>Sıklık (n)</b>	<b>Yüzde (%)</b>
HKHN	32	41,5
Hematolojik	23	29,8
Diğer hastalıklar	10	12,9
SOT	7	9,1
HIV	3	3,9
cCMV	2	2,6
<b>Toplam</b>	<b>77</b>	<b>100</b>

HKHN: hematopoetik kök hücre nakli, SOT: solid organ transplantasyonu, HIV: insan immün yetmezlik virüsü, cCMV: konjenital CMV enfeksiyonu

Öncelikle gansiklovir direncine sebep olan mutasyonların hasta gruplarına göre dağılımı incelenmiştir. Direnç saptanan hastaların ikisi de HKHN alıcısı hasta grubunda olsa da gruplar arasında direnç yönünden anlamlı bir fark saptanmamıştır ( $p=0,610$ ). Hasta gruplarında direnç analizi yapılan kişi sayısı ve direnç dağılımı Tablo 4.5'te gösterilmiştir.

**Tablo 4.5.** Hasta gruplarında direnç analizi yapılan kişi sayısı ve direnç dağılımı

	<b>HKHN n=32</b>	<b>SOT n=7</b>	<b>HIV n=3</b>	<b>cCMV n=2</b>	<b>Hematolojik n=23</b>	<b>Diğer n=10</b>	
<b>Dirençli hasta sayısı (n)</b>	2 (%6,3)	0	0	0	0	0	$p=0,610$

cCMV: konjenital CMV enfeksiyonu

n: direnç analiz sonucu elde edilen hasta sayısı

#### 4.1.1. HKHN Hastalarının Özellikleri

Çalışmaya alınan hasta grupları içerisinde 32 (%41,5) hasta ile en büyük grubu HKHN alıcıları oluşturmaktadır. Bu hastalardan 27 (%84,3) allojenik HKHN alıcısı iken beşi otolog HKHN alıcısıdır. Bu gruptaki hastalar altta yatan temel hastalık açısından heterojen bir gruptur. Bu gruptan 24 hastaya nakil öncesi anti-CMV IgG bakılmış ve 22 hastanın pozitif iki hastanın negatif olduğu görülmüştür.

Hastaların klinikleri incelenecek olursa üç hastada olası akciğer tutulumu ve bir hastada CMV pnömonisi olduğu görülmüştür. CMV pnömonisi tanısı alan hasta A594V mutasyonu görülen hastadır. Yine bu grupta iki hastada GİS tutulumu ve üç hastada retina tutulumu görülmüştür. CMV retiniti tanısı ile tedavi edilen bir hastada ise M460V direnç ilişkili mutasyonu görülmüştür. Bir AIDS hastasında görülen akciğer tutulumu hariç tüm CMV hastalığına sahip olan hastalar bu gruptadır.

Tedavi yanıtlarına bakıldığında, tüm hasta grupları içerisinde etkin tedaviye yanıtı olmayan sekiz hastanın da bu gruba dahil olduğu anlaşılmıştır. Yine etkin tedaviye olası yanıtı olmayan bir hastanın bu grupta olduğu görülmektedir. On sekiz hasta tedaviye yanıt verirken beş hastanın tedavi yanıtı değerlendirilememiştir. HKHN alıcısı hastalardan dördü tedavi aşamasında vefat etmiştir.



#### 4.1.2. SOT Hastalarının Özellikleri

SOT yapılan hastalardan altı tanesine böbrek, bir tanesine de karaciğer nakli yapılmıştır. Hastalardan üç tanesi kadındır. SOT hastalarının hiçbirinde olası ya da kesin organ tutulumu görülmemiştir. Hastalar tedavi amacıyla ortalama 27,3 gün gansiklovir, 42 gün valgansiklovir kullanmışlardır. SOT hastalarının altısı etkin tedaviye yanıtı iken, bir hastanın tedavi yanıtı değerlendirilememiştir. Hastaların tamamında nakil öncesi anti-CMV IgM negatif, anti-CMV IgG pozitif bulunmuştur. İki hasta ise tedavi takibinde kaybedilmiştir.

#### 4.1.3. HIV ile Yaşayan Bireylerin Özellikleri

Bu çalışmada üç hastada HIV enfeksiyonuna bağlı AIDS tablosu ortaya çıkmış ve bu hastalar fırsatçı CMV enfeksiyonu tanısı ile takip edilmiştir. Hastalardan iki erkek biri kadındır. Hastaların yaş ortalaması 40 ve ortanca yaş 44 şeklindedir. Hastaların birinde otopsi ile doğrulanmış CMV pnömonisi saptanmıştır. İki hastaya gansiklovir tedavisi verilmiş ve ortalama tedavi süresi 13 gün olarak bulunmuştur. Bir hastaya ise üç doz sidofovir tedavisi uygulanmıştır. Bir hasta hariç diğer hastalar tedaviye yanıt vermişlerdir. Hastaların tamamı, derin immün yetmezlik sebebiyle, takip esnasında hayatlarını kaybetmişlerdir.

#### 4.1.4. Konjenital CMV Enfeksiyonu Bulunan Hastaların Özellikleri

Çalışmaya dahil edilen 77 hastanın ikisinde cCMV enfeksiyonu mevcuttur. Hastaların tamamında anti-CMV IgM antikorları araştırılmış ve birinde pozitif olduğu görülmüştür. Bu hastaların bir tanesinde olası SSS tutulumu bulguları saptanmış ve bu hasta 180 gün boyunca gansiklovir tedavisi almıştır. Diğer hastalar da tedavi süreci tamamlanana kadar gansiklovir tedavisi almışlardır. Bu hastalarda gansiklovir tedavi yanıtı zıllığı gelişmemiştir.

#### 4.2. Plazmadan Viral DNA İzolasyonu ve PZR Bulguları

Çalışmaya dahil edilen 142 hastaya ait 142 plazma örneğine viral DNA izolasyon işlemi uygulanmıştır. Yukarıda anlatıldığı şekilde plazma izolatları PZR

işlemine alınmış ve elde edilen sonuçlar değerlendirilmiştir. 142 hasta plazmasının 77 (%54,2) tanesinde hedef bölgeye uygun bant görülürken 65 (%45,78) hastaya ait viral DNA izolatında bant saptanmamıştır. Ticari gerçek zamanlı kPZR platformu temel alındığında, viral DNA yükü 1000 IU/ml ve üzerinde olan hastalar için çalışma duyarlılığı %54,2 olarak bulunmuştur. Bant saptanmayan hastaların izolatlarına tekrar PZR işlemi uygulanmış ancak yine hedef bölgede bant görülmemiştir. Beş hasta üzerinde yapılan bir PZR deneyine ait görüntü Şekil 4.1’de gösterilmiştir.



**Şekil 4.1.** Beş hasta üzerinde yapılan PZR sonucunun görüntülenmesi. A) Baz uzunluğu 100 baz çifti halinde artan DNA ladder (Genedirex Cat:DM001-R500). B) Pozitif kontrol. C) virüs yükü 2000 IU/ml olan hasta izolatı (hedef bölgede bant olduğu görülmekte). D) virüs yükü 5800 IU/ml olan hasta izolatı (hedef bölgede bant olduğu görülmekte). E) virüs yükü 3700 IU/ml olan hasta izolatı (hedef bölgede bant saptanmamıştır). F) virüs yükü 12300 IU/ml olan hasta izolatı (hedef bölgede bant olduğu görülmekte). G) virüs yükü 137000 IU/ml olan hasta izolatı (hedef bölgede bant olduğu görülmekte). H) Negatif kontrol.

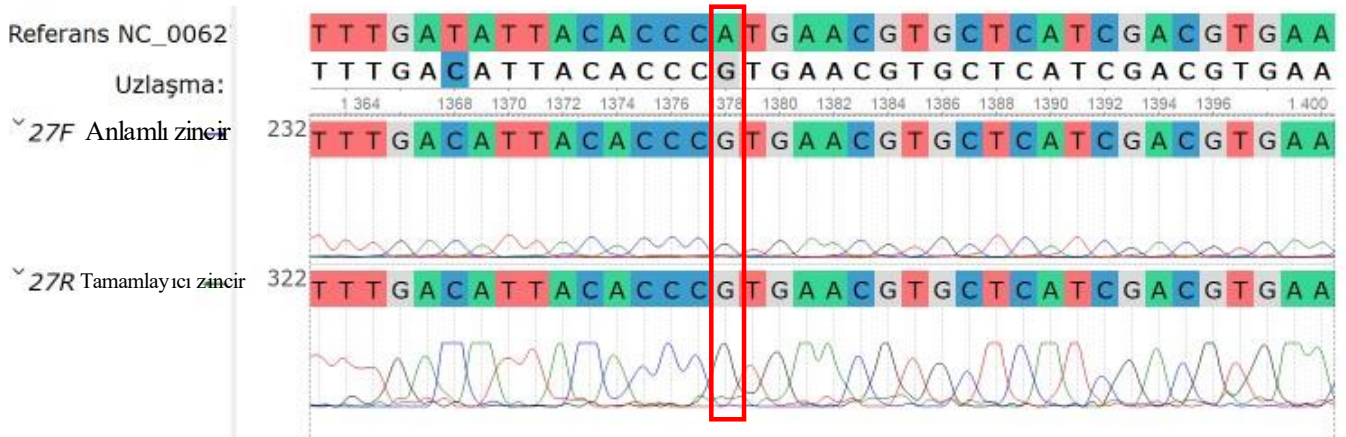
### 4.3. DNA Dizi Analizi Bulguları

Hedef bölgede bant saptanan 77 hastanın verileri UGENE™ (v46) programı kullanılarak analiz edilmiştir (117). Analiz aşamasında bu hastaların tamamında gansiklovir direncini değerlendirmek üzere anlamlı ve tamamlayıcı diziler birleştirilerek uzlaşma dizisi elde edilmiştir. Elde edilen dizi, mutasyon saptayan ve

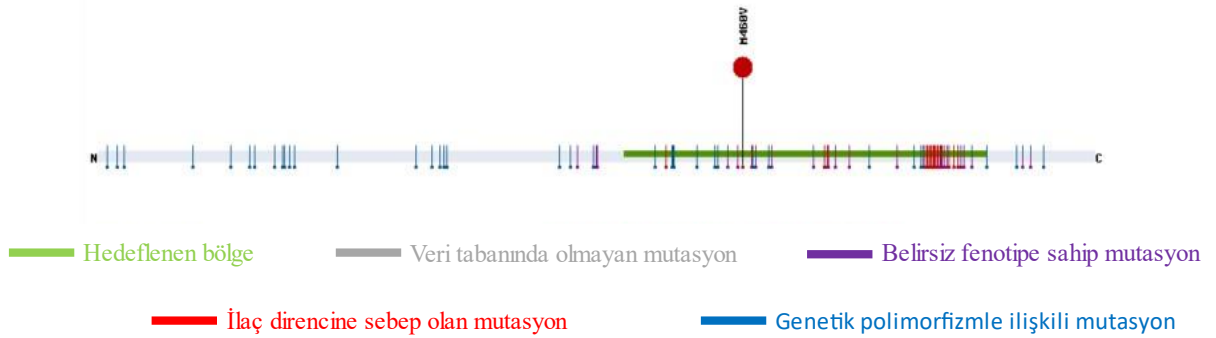
mutasyonun dirence etkisini analiz eden platforma (MRA) yüklenmiş ve direnç sonuçları değerlendirilmiştir. (118).

Direnç analizi sonucunda iki hastada gansiklovir direncine sebep olan mutasyon saptanmıştır. Bu mutasyonların M460V ve A594V şeklinde sırayla 12 ve 37 numaralı hastalarda olduğu görülmüştür. İki hastada da tedaviye klinik yanıtsız viremi ve aynı zamanda organ tutulumu mevcuttur. Gansiklovir direncine sebep olan mutasyon saptanan bu iki hastanın direnç özellikleri aşağıda ele alınmıştır.

Direnç ilişkili mutasyon saptanan hastalardan ilki, 12 numaralı hasta, üç yaşında erkek olup, kombine immün yetmezlik sebebiyle allojenik HKHN yapılmıştır. Tekrarlayan CMV enfeksiyonları ile takip ve tedavi edilmektedir. İlk kez kanda viremi saptandıktan sonra hastalık gelişmesini önlemek amacıyla valgansiklovir tedavisi başlanmıştır. Sistemik muayenesinde iki gözünde de CMV retinitisi ile uyumlu bulgu olduğu görülmüştür. Etkin tedaviye rağmen hastanın göz bulguları ilerlemiş ve bu bulguların üzerine SSS belirtileri de eklenmiştir. Hastanın kliniği CMV kaynaklı olası SSS tutulumu yönünde değerlendirilmiştir. Tedaviye gansiklovir (IV) ile devam edilmiş olmasına rağmen tedavi yanıtı alınamamıştır. Bu şekilde hasta belirli aralıklarla 385 gün boyunca gansiklovir/valgansiklovir tedavisi almıştır. Hastanın tedavisine foskarnet ile devam edilmiştir. 42 günlük foskarnet tedavisinin ardından SSS bulguları tamamen düzelmiştir. Ancak göz bulguları azalmakla birlikte tam iyileşme sağlanamamıştır. Gansiklovir tedavisinin 12. ayında alınan plazma örneğine antiviral direnç testi uygulanmış ve M460V mutasyonu saptanmıştır. Bu mutasyon sonucunda gansiklovir tedavisine karşı orta düzeyde direnç (5-15 kat) ortaya çıkmıştır (25, 72, 110, 119). Hastanın ayaktan takibi devam etmektedir. Hastanın plazmasında saptanan mutasyon dizisi ve ortaya çıkan direnç sırayla Şekil 4.2. ve Şekil 4.3'te gösterilmiştir.



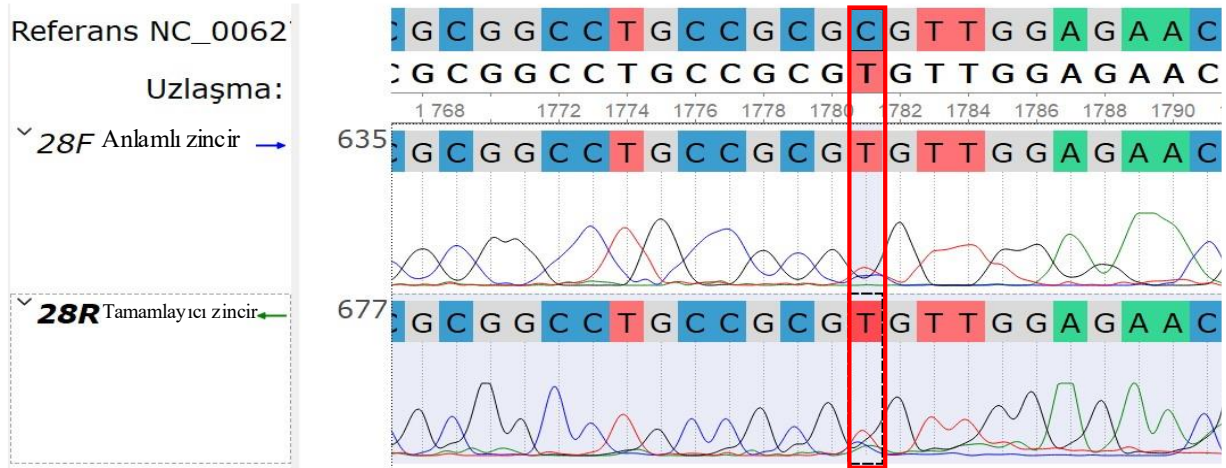
**Şekil 4.2.** 12 numaralı hastaya ait dizi verisi. UL97 geninin 1378. pozisyonundaki ‘Adenin’ nükleotidinin yerini hem anlamlı zincir hem de tamamlayıcı zincirde mutasyon sonucu ‘Guanin’ nükleotidinin aldığı görülmektedir (Şekil üzerinde işaretlenmiştir). Sonuçta ‘Metiyonin’ aminoasidinin kodlanması gerekirken ‘Valin’ aminoasidi kodlanmış ve bu mutasyon gansiklovir direnciyle sonuçlanmıştır (şekil, Unipro UGENE™ (v46) programından alınarak Türkçeye uyarlanmıştır).



**Şekil 4.3.** On iki numaralı hastaya ait MRA (118) platformu üzerinden alınan mutasyon analiz sonucu. Yeşil çizgi platforma yüklenen 12 numaralı hastaya ait dizi uzunluğunu göstermektedir. M460V mutasyonu kırmızı çizgi ile vurgulanmıştır (şekil, MRA (118) platformundan alınarak Türkçeye uyarlanmıştır).

Direnç ilişkili mutasyon saptanan 37 numaralı hasta ise yaygın değişken immün yetmezlik (CVID) tanısı olan 14 yaşında kadın hastadır. Hasta tekrarlayan alt solunum yolu enfeksiyonları, geçirilmiş CMV pnömonisi ve CMV viremi ile takip ve tedavi edilmektedir. CMV hastalığını önleyici tedavi açısından anlamlı olan ilk PZR

sonucundan sonra gansiklovir (IV) tedavisi başlanmıştır. Damardan tedavi tamamlandıktan sonra ağızdan valgansiklovir idamesiyle taburcu edilmiştir. Valgansiklovir idamesi devam ederken ateş ve genel durum bozukluğu şikayetiyle hastaneye başvurmuştur. Yapılan laboratuvar çalışmaları sonucu klinik tedaviye yanıtız CMV enfeksiyonu tanısı koyularak valgansiklovir kesilmiş gansiklovir (IV) tedavisine geçilmiştir. Hasta aralıklı olacak şekilde toplam 300 gün gansiklovir tedavisi almıştır. Gansiklovir tedavisi devam ederken, geçirilmiş CMV pnömonisi de düşünülerek hastaya damar içi insan antikoru (IVIG) tedavisi de uygulanmıştır. Hastada klinik tedaviye yanıtız CMV hastalığı olsa da uzun süre sonunda alt solunum yolu hastalığı düzelmiş ve kandaki CMV yükü 1000 IU/ml'nin altına indirilmiştir. Virolojik direnci araştırmak için tedavinin yedinci ayında alınan plazma örneğine yönelik yapılan genotipik direnç testinde A594V mutasyonu saptanmıştır. Bu mutasyon sonucunda gansiklovir tedavisine karşı orta düzeyde direnç (5-15 kat) varlığı virolojik düzeyde gösterilmiştir (110, 120). Bu hasta çocuk immünoloji ve çocuk enfeksiyon klinikleri tarafından ayaktan takip edilmekte ve kanındaki CMV DNA yükü 1000-2000 IU/ml arasında bulunmaktadır. Hastada saptanan mutasyon dizisi ve ortaya çıkan direnç sırayla Şekil 4.4. ve Şekil 4.5'te gösterilmiştir



**Şekil 4.4.** 37 numaralı hastaya ait dizi verisi. UL97 geninin 1781. pozisyonundaki 'Sitozin' nükleotidinin yerini hem anlamli zincir hem de tamamlayıcı zincirde mutasyon sonucu 'Timin' nükleotidinin aldığı görülmektedir (şekil üzerinde işaretlenmiştir). Sonuçta 'Alanin' aminoasidinin kodlanması gerekirken 'Valin' aminoasidi kodlanmış ve bu mutasyon gansiklovir direnciyle sonuçlanmıştır (Şekil, Unipro UGENE™ (v46) programı kullanılarak Türkçeye uyarlanmıştır).



**Şekil 4.5.** Şekilde 37 numaralı hastaya ait MRA (118) platformu üzerinden alınan mutasyon analiz sonucu görülmektedir. Yeşil çizgi platforma yüklenen 37 numaralı hastaya ait dizi uzunluğunu göstermektedir. A594V mutasyonu kırmızı çizgi ile vurgulanmıştır (şekil, MRA (118) platformundan alınarak Türkçeye uyarlanmıştır).

Genotipik direnç analizi sonucu gansiklovir direnci saptanan hastalara ait diğer laboratuvar ve klinik özellikler Tablo 4.6’da ele alınmıştır.

**Tablo 4.6.** Direnç ilişkili mutasyon saptanan hastalara ait diğer laboratuvar ve klinik özellikler

Özellik	12 numaralı hasta		37 numaralı hasta
Yaş (yıl)	3		14
Cinsiyet	Erkek		Kadın
İmmün yetmezlik sebebi	HKHN		HKHN
Aldığı tedavi	(Val) Gansiklovir <sup>a</sup>	Foskarnet	Gansiklovir
Tedavi süresi (gün)	385	42	185
Tanı virüs yükü (IU/ml)	3781		58543
En yüksek virüs yükü (IU/ml)	2448704		11858455
Anti-CMV IgM	Pozitif		Pozitif
Anti-CMV IgG	Pozitif		Pozitif
Tedaviye yanıtı <sup>b</sup>	Evet		Evet
Organ tutulumu <sup>c</sup>	Retinit, olası SSS enfeksiyonu		Pnömoni

<sup>a</sup> Hasta aralıklarla hem gansiklovir hem valgansiklovir tedavisi almıştır.

<sup>b</sup> (95) numaralı kaynağa göre değerlendirilmiştir.

<sup>c</sup> (50) numaralı kaynağa göre değerlendirilmiştir.

Çalışmada yapılan analiz sonucunda 77 hastanın beşinde (%6,5), gansiklovir direncine olan etkisi bilinmeyen üç farklı mutasyon saptanmıştır. Bu mutasyonların, A427T bir hastada (105 numaralı hasta), A435V bir hastada (32 numaralı hasta) ve geriye kalan üç hastada ise A542I (59, 90 ve 110 numaralı hastalar) şeklinde olduğu görülmüştür. İlgili hastalara ait dizilerde saptanan mutasyonların direnç fenotipleri MRA platformunun veri tabanında bulunmamaktadır. Güncel literatürde bu mutasyonların fenotipik dirence etkisini ortaya koyan bir yayın bulunmamaktadır (4, 25, 72, 76, 121, 122). Bu mutasyonlar ve mutasyonların saptandığı hastalara ait özellikler Tablo 4.7’de gösterilmiştir.

A427T mutasyonun saptandığı hasta majör histokompatibilite kompleksi sınıf II mutasyonu olan bir yaşında erkek çocuktur. Yapılan HKHN sonrasında CMV viremi saptanmış ve ardından valgansiklovir tedavisi uygun dozda başlanmıştır. Hastada tekrarlayan CMV enfeksiyonu nedeniyle aralıklı olarak toplamda 122 gün valgansiklovir tedavisi almıştır. Hastada, olası ya da kesin CMV hastalığı belirti ve bulgusuna rastlanmamıştır. Genotipik direnç analizi sonucunda hastada A427T mutasyonu bulunmuş olsa da antiviral tedaviye yanıtızlık gelişmemiştir. Hastanın ayaktan takibi devam etmektedir (bakınız Tablo 4.7).

Direnç ilişkisi bilinmeyen mutasyonun saptandığı diğer hasta juvenil miyelomonositik lösemi tanısı ile HKHN yapılan beş yaşında erkek çocuktur. Nakil sonrası gelişen CMV enfeksiyonu nedeniyle toplamda 71 günlük gansiklovir tedavisi almış ve bu süreçte CMV’nin sebep olduğu organ tutulumu gelişmemiştir. Hastada yapılan direnç analizinde A435V mutasyonu saptanmıştır. Bu mutasyon hastada tedaviye yanıtızsız enfeksiyona sebep olmamıştır. Hastanın takibi devam etmektedir (bakınız Tablo 4.7).

V542I mutasyonu üç farklı hastada saptanmıştır. Bu hastalardan ilki ani gelişen solunum yetmezliği nedeniyle acile getirilen ve ardından pnömoni ön tanısı ile yoğun bakıma yatırılan 27 yaşında erkek hastadır (59 numaralı hasta). Hastane sisteminden hastada HIV enfeksiyonu olduğu ve antiretroviral ilaçlarını kullanmadığı öğrenilmiş ve tetkiklerinde AIDS tablosunda olduğu görülmüştür. Hastaya CMV pnömonisi ön tanısıyla gansiklovir tedavisi başlanmıştır. Yatıştan iki hafta sonra hasta vefat etmiştir. Yatışında 12 gün gansiklovir tedavisi almıştır. Yapılan otopsi sonucunda akciğer

dokusunda CMV hastalığı gösterilmiştir. Hasta, CMV pnömonisinin tedaviye yanıtını değerlendirebilmek için gerekli süre dolmadan vefat ettiğinden dolayı tedavi yanıtı açısından değerlendirmeye alınamamıştır (bakınız Tablo 4.7). V542I mutasyonunun saptandığı ikinci hasta ise interlökin-10 (IL-10) gen defekti tanısı alan ve ardından HKHN yapılan bir yaşında erkek çocuktur (90 numaralı hasta). Hasta CMV enfeksiyonu nedeniyle toplamda 72 gün gansiklovir tedavisi almıştır. Tedavi boyunca ilaca yanıtızsızlık ortaya çıkmamıştır. Hastanın takibinde CMV organ hastalığı gelişmemiştir. Hastanın ayaktan takibi devam etmektedir (bakınız Tablo 4.7). Söz konusu mutasyonun görüldüğü son hasta foliküler non-Hodgkin lenfoma (NHL) tanısı olan 44 yaşında erkek hastadır. Hasta CMV enfeksiyonu için önerilen 21 günlük gansiklovir tedavisini tamamlamıştır. Sonrasında hastada CMV enfeksiyonu veya hastalığı gelişmemiştir. Hasta erişkin hematoloji tarafından ayaktan takip edilmektedir (bakınız Tablo 4.7).

**Tablo 4.7.** Direnç ilişkisi bilinmeyen mutasyonların saptandığı hastaların özellikleri

Mutasyon	A427T	A435V	V542I		
Hasta numarası	105	32	59	90	110
İmmün yetmezlik	HKHN	HKHN	AIDS	HKHN	Hematolojik
Organ tutulumu <sup>a</sup>	Yok	Yok	Pnömoni	Yok	Yok
Aldığı tedavi	Valgansiklovir	Gansiklovir	Gansiklovir	Gansiklovir	Gansiklovir
Tedavi süresi (Gün)	122	71	12	72	21
Tedaviye yanıtızsızlık <sup>b</sup>	Hayır	Hayır	Uygulanamaz	Hayır	Hayır
Sağ kalım	Yaşıyor	Yaşıyor	Exitus	Yaşıyor	Yaşıyor
Temel hastalık	Majör histokompatibilite kompleksi sınıf II mutasyonu	Juvenil Miyelomonositik Lösemi	HIV enfeksiyonu	İnterlökin-10 (IL-10) gen defekti	Foliküler Non-Hodgkin lenfoma (NHL)

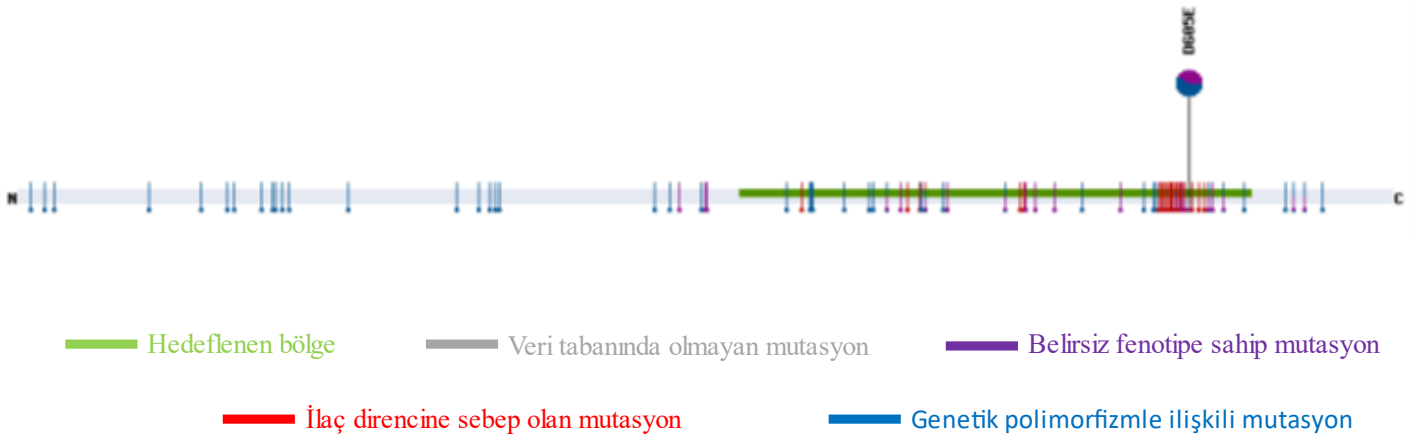
<sup>a</sup>(50) numaralı kaynağa göre değerlendirilmiştir.

<sup>b</sup>(95) numaralı kaynağa göre değerlendirilmiştir.



Hedeflenen gen bölgesinin dizi analizi sonucunda iki (%2,6) hastada genetik polimorfizmle ilişkili olan D605E mutasyonu saptanmıştır (72, 98). Bu hastaların ilki 68 yaşında, eşlik eden otoimmün hastalık tedavisi için immün baskılayıcı ilaç kullanmakta olan bir kadın hastadır. Plazma numunesinde CMV DNA saptanan hastaya gansiklovir tedavisi verilmemiş, bunun yerine immün baskılayıcı tedavinin dozu azaltılmıştır. Sonrasında CMV viremi saptanamayacak düzeyin altına gerilemiştir. Hastanın takibi devam etmektedir.

D605E mutasyonu saptanan diğer hasta akut miyeloid lösemi tanısı sonrasında yarı uyumlu vericiden HKHN yapılan 32 yaşında kadın hastadır. Hasta organ tutulumu olmaksızın CMV viremi tedavisi için aralıklı olacak şekilde 54 gün gansiklovir tedavisi almıştır. Tedavi boyunca gansiklovire karşı yanıtızsızlık gelişmemiştir. Bu hastaya ait mutasyon analizi Şekil 4.6’da gösterilmiştir.



**Şekil 4.6.** Genetik polimorfizmle ilişkili mutasyon saptanan hastaya ait MRA (118) platformu üzerinden alınan analiz sonucu. Yeşil çizgi platforma yüklenen hastaya ait dizi uzunluğunu göstermektedir. D605E mutasyonu mavi çizgi ile vurgulanmıştır (şekil, MRA (118) platformundan alınarak Türkçeye uyarlanmıştır)

## 5. TARTIŞMA

İmmün sistem yetmezliği olan hasta grupları, nakil uygulamaları ve immün sistemi baskılayan enfeksiyonların artmasıyla birlikte gün geçtikçe daha yaygın hale gelmektedir. Bu durum ise fırsatçı CMV enfeksiyonlarının görülme sıklığını artırmakta ve doğal olarak CMV organ hastalığı, antiviral ilaç direnci, tedavi süreleri ve maliyetlerinde artış olarak karşımıza çıkmaktadır. Solid organ transplantasyonu yapılan hastalarda, nakledilen organın reddedilmesini önlemek amacıyla, kullanım onayı alan yeni immün baskılayıcı ilaçların kullanıma girmesiyle birlikte bu hasta grubunda CMV enfeksiyonlarının görülme sıklığı artmıştır (123). HIV enfeksiyonlarının yönetiminde HAART tedavisinin kullanıma girmesiyle birlikte CMV organ tutulumları azalsa da HIV bulaşının yaygınlaşmasıyla birlikte HIV ile yaşayan bireylerin sayısının zamanla arttığı akılda tutulmalıdır (124). Tüm bu nedenlerden dolayı ölüm ve ciddi kalıcı hastalıkların önlenmesi için CMV enfeksiyonlarının erken tanı ve tedavisi önem kazanmıştır. Etkin tedaviye rağmen hedeflenen yanıtın alınmadığı durumlarda ise laboratuvarlar tarafından direnç ilişkili mutasyonların araştırılması hayati öneme sahiptir. Direncin gösterilmesiyle birlikte tedavi yaklaşımları değiştirilmekte ve bu durum ölüm, hastalık gelişimi ve maliyetlerin azaltılması gibi katkılar sağlamaktadır.

Çalışmamızda 32 hasta HKHN alıcısı olup, bu grupta klinik bulgular ele alındığında üç hastada olası akciğer tutulumu, bir hastada kesin pnömoni saptandığı görülmektedir. Literatürde Grundy ve ark. 1987 yılında yaptıkları çalışmada profilaksi ve önleyici tedavi almayan seropozitif HKHN alıcılarında nakil sonrası %15 oranında CMV pnömonisi geliştiği bulunmuştur (125). Etkin profilaksi ve önleyici tedavilerin kullanıma girmesiyle birlikte günümüzde bu oranın %2-%6 arasına gerilediği görülmektedir (126). Şüphesiz, klinik olarak bu gelişmenin ardında, nakilden sonra kazanılmış T hücre yanıtının baskılandığı dönemde medikal tedavilerin CMV replikasyonunu durdurması yatmaktadır. Waller ve ark. CMV'ye özgül T hücre yanıtı üzerine yaptıkları çalışma bu bilgiyi güçlü bir şekilde desteklemektedir (127). Liu ve ark. Çin'de, 488 HKHN alıcısı ile yaptıkları çalışmada CMV kaynaklı akciğer tutulumunun %4,9 olduğu gösterilmiştir. Ayrıca söz konusu çalışmada %1.2 oranında GİS tutulumu ve bir (%0,2) hastada ise SSS tutulumu olduğu saptanmıştır (128).

Çalışmamızda kesin ve olası akciğer tutulumları birlikte düşünülecek olursa, HKHN alıcılarında %12,5 (4/32) oranında akciğer tutulumu olduğu görülmüştür. Bu sonuç literatür ile uyumludur. Söz konusu hastalara verilen anti-CMV tedavisiyle birlikte olası ve kesin akciğer tutulumu olan HKHN hastalarının bir yıllık sağ kalımı %100'dür. Ayrıca bu hasta grubunda %6,25 (2/32) oranında GİS tutulumu olması da literatürle uyumludur.

HKHN alıcılarının CMV açısından tedavi yaklaşımları incelendiğinde, çalışmaya dahil edilen 77 hasta içerisinde güncel etkin tedaviye yanıtı olmayan sekiz hastanın tamamının HKHN alıcısı olduğu görülmektedir. Hastaların tamamına gansiklovir tedavisi verilmiştir. Güncel rehberlere bakılacak olursa; CMV enfeksiyonlarının önlenmesi için en az iki haftalık (val) gansiklovir tedavisi verilmeli ve ardından idame tedavisine geçilmelidir (8). Bu yaklaşım hasta grubumuza aynen uygulanmaktadır. Ayrıca, letermovir Avrupa ve ABD'de CMV seropozitif HKHN alıcılarında profilaksi amacıyla kullanım onayı almıştır (8, 59). Toplumumuzda CMV seropozitifliği göz önüne alındığında, letermovirin önce laboratuvar çalışmalarıyla ve ardından klinik çalışmalarla klasik tedaviye yanıtı olmayan hastalar üzerinde etkinliğinin araştırılması gerekmektedir. Sonuçlar tedavi başarısı, yan etki profili, hastalık, ölüm ve maliyet açısından değerlendirilmelidir.

Etkin tedaviye klinik yanıtı tanımlanırken bazı önemli noktalara dikkat edilmelidir. Bunlardan ilki, tedaviye yanıtı değerlendirmek için başlangıç zamanı olarak hastadan alınan örnek zamanı değil, hastaya tedavinin ilk uygulandığı an başlangıç zamanı kabul edilmelidir. Diğer önemli sorun ise, özellikle çocuk hastalarda, ağızdan valgansiklovir tedavisinin ayaktan uygulanması sırasında yaşanmaktadır. Hasta, verilen tedaviye yeterli uyumu sağlayamazsa CMV reaktivasyonu ile hastaneye gelmekte ve hastaya yanlış olarak tedaviye yanıtı olmayan CMV enfeksiyonu tanısı koyulmaktadır. Bu aşamada hasta takibini yapan hekim ile laboratuvar hekiminin hastayı birlikte değerlendirmesi hayati önem arz etmektedir.

Çalışmamızda yedi hastaya SOT yapılmış ve hiçbir hastada olası ya da kesin CMV hastalığı saptanmamıştır. Bu bulgunun sebebi gruptaki hasta sayısının kısmen az olması ile açıklanabilir. Nakil öncesi anti-CMV IgG antikorları hastaların tamamında pozitifdir. Güncel rehberlere bakılacak olursa çalışmamızdaki tüm SOT alıcıları orta risk grubuna dahil olmaktadır (25). Rehberlerde orta riskteki hastalara üç

aylık valgansiklovir profilaksisi ya da hastalık gelişimini önleyici tedavi yaklaşımı önerilmektedir (25). Çalışmaya alınan SOT alıcısı hastalara da bu yaklaşım uygulanmıştır.

Maribavir, standart tedaviye yanıtızsız nakil alıcılarında kullanım onayını almıştır (93). Özellikle standart tedaviye yanıtızsız nakil hastalarından izole edilen CMV suşlarına maribavirin *in vitro* etkisi araştırmaya açık bir alandır.

Çalışmamıza dahil olma şartlarına uyan üç HIV hastası dahil edilmiştir. Bu hastalardan bir tanesi CMV pnömonisi sebebiyle kaybedilmiştir. Kaybedilen bu hastanın HAART tedavisine uyumsuz olduğu bilinmektedir. Diğer hastalarda herhangi bir organ tutulumu bulunmamaktadır. Literatür incelendiğinde özellikle HAART tedavisinden önce AIDS tablosundaki hastalarda %20-40 oranında fırsatçı CMV enfeksiyonlarının ortaya çıktığı görülmektedir (58). HIV tedavinde HAART yaklaşımından sonra CMV enfeksiyonlarının azaldığı görülmüştür (124). Bu durum özellikle kazanılmış hücrel immün yanıtın yeniden yapılanmasının CMV enfeksiyonlarının önlenmesindeki önemini açıkça ortaya koymaktadır.

Retinit, HIV hastalarında en sık görülen fırsatçı CMV hastalığıdır (22). Çalışmamıza dahil edilen hastalara bakıldığında retinit tablosunun saptanmadığı görülmektedir. Gruptaki hasta sayısının az olması ve hastaların derin immün yetmezlik nedeniyle hızla kaybedilmeleri, bu durumun nedenleri arasında düşünülebilir.

HIV hastalarında CMV enfeksiyonlarının tedavi yaklaşımı nakil alıcılarından farklıdır. HIV hastalarında CMV profilaksisi önerilmemekte, bunun yerine gelişen hastalığın (val) gansiklovir ile tedavi edilmesi ve ardından idame tedavisine geçilmesi önerilmektedir (129). Ancak uzun dönem gansiklovir tedavisinin antiviral direnç gelişimine sebep olabileceği unutulmamalıdır. Bu noktada, HIV hastalarında CMV hastalığı geliştikten sonra idame tedavisinin etkinliği ve idame tedavinin verilmesi yerine hastalık gelişmesini önleyici tedavinin karşılaştırıldığı klinik çalışmalara ihtiyaç vardır. Bu klinik etkinlik çalışmaları esnasında CMV'ye özgül hücrel yanıt da çalışmalara kontrollü olarak eklenebilir.

Çalışmamızda toplam iki konjenital CMV enfeksiyonu hastası çalışmaya dahil edilmiştir. Hastalardan sadece bir tanesinde olası SSS tutulumu bulunmaktadır. Konjenital CMV enfeksiyonunun kesin tanısı yaşamın ilk 21 gün içerisinde idrarda

CMV'nin gösterilmesiyle koyulmaktadır (130). Anti-CMV IgM yol gösterici olmakla birlikte kesin tanı için kullanılmamaktadır.

Antiviral direnç, fenotipik ve genotipik yöntemler kullanılarak araştırılmaktadır. Genotipik yöntemler uygulama kolaylığından dolayı daha yaygın olarak tercih edilmektedir. Genotipik testi uygulayabilmek için gerekli olan CMV genomu, hastadan alınan numunenin hücre kültüründe çoğaltılarak izole edilebileceği gibi numuneden direkt CMV DNA'sının izolasyonu ile de elde edilebilir. Hücre kültürü, emek yoğun olması, deneyimli personel ihtiyacı, sonuçların tekrarlanabilirliğinin düşük olması ve CMV replikasyonunun yavaş gerçekleşmesi gibi sebeplerden dolayı daha az tercih edilmektedir. Bundan dolayı, insanlarda hastalık etkeni olan diğer virüslerde olduğu gibi, CMV için de direkt numuneden elde edilen virüs DNA'sının genotipik yöntemler kullanılarak antiviral direnç araştırılması, olanakları olan laboratuvarlar tarafından tercih edilmektedir.

Genotipik yöntemlerle viral direnç çalışma sürecinde en önemli aşamalardan ilki numuneden direkt CMV DNA izolasyon aşamasıdır. Bu aşama hastadan numunenin alınmasıyla başlayıp PZR işlemine kadar sürmektedir. Bu çalışmada 142 plazma numunesi CMV DNA izolasyon işlemine alınmış ancak 77 (%54,2) hastada hedef bölge amplifikasyonu saptanmıştır. Hasta plazmaları rutin laboratuvar işlemlerinde, önce -20 °C'de dondurulmakta, yeterli plazma sayısına ulaşıncaya işleme alınırken tekrar çözülmemektedir. Hasta sonuçları çıkana kadar (bazen 3 gün sürmekte) tüm plazmalar 4 °C'de bekletilmekte, sonuçlar onaylandıktan sonra tekrar -20 °C'de saklanmaktadır. Bu çalışmada bant saptanamayan hastaların bazılarının DNA izolasyonuna hazırlık aşamasında kaybedildiği düşünülebilir. Bu konuda yapılan çalışmalara bakılacak olursa, Xie ve ark. (131) düşük, orta ve yüksek seviye CMV DNA yükleri olan 30 hastaya ait plazma numunelerini 0. günden 21. güne kadar 4°C'de bekletmişlerdir, ardından 0, 1, 2, 3, 7, 14 ve 21. günlerde bu hastaların plazmalarından gerçek zamanlı kPZR tekrarı yaparak saptanan virüs yükündeki değişimleri araştırmışlardır. Hiçbir hasta grubundaki virüs yükünde istatistiksel olarak anlamlı değişiklik saptanmamıştır. Söz konusu çalışmada, plazmaların dondur-çöz işlemi yapılmadan, sürekli 4 °C'de tutulmuş olması viral DNA yükünde değişiklik olmamasını sağlamış olabilir.

Roberts ve ark. böbrek nakli yapılan 10 hastaya ait tam kan numunesini 4 °C’de ve oda ısısında 6, 24, 48 ve 72 saat bekleterek CMV enfeksiyöz virion titresini ve CMV DNA virüs yükününün değişimini araştırmışlardır (132). Bu araştırma için hem hızlı hücre kültürü yöntemini (Shell-vial) hem de kPZR yöntemlerini kullanmışlardır. Sonuçta, hızlı hücre kültürünün duyarlılığı her iki sıcaklık ortamında da 24 saatin sonunda %50 oranında azalmıştır. Buna karşılık, tüm saat dilimleri ve sıcaklıklarda tekrarlanan kPZR deneylerinde ise CMV DNA yükleri arasında anlamlı fark saptanmamıştır. Bu çalışmadan da anlaşılacağı üzere hasta numunelerini kısa süreli aynı sıcaklıkta bekletmenin kPZR ile CMV DNA yükleri üzerine etkisi ihmal edilebilir.

Tarafımızca yapılan bu çalışmada hasta plazma numuneleri yaklaşık bir yıl boyunca ileriye dönük olarak toplanmıştır. Ayrıca hasta plazmalarının belli zaman aralığında farklı sıcaklık değerlerinde beklemiş olması da çalışmamızdaki viral DNA yükünde azalma olması ihtimalini desteklemektedir. DNA izolasyon ve PZR deneyleri esnasında yeni numunelerde, eski numunelere oranla daha çok pozitiflik saptanmış olması (paylaşılmamış veri) da bu ihtimali desteklemektedir.

Hedeflenen plazma sayısına ulaşıldıktan sonra viral DNA izolasyon deneyleri gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada gereç ve yöntem bölümünde anlatılan manuel ticari kit kullanılmıştır. Manuel ticari kitlerin performansları farklı numune tiplerine, farklı çalışma hacim ve sürelerine ve manuel testi uygulayan kişiye göre değişebilmektedir. Bu nedenle her bir ticari kitin performans özellikleri değişiklik göstermektedir. Ayrıca yüksek hasta sayısı olan laboratuvarlar için de emek yoğun yöntemlerdir.

Gary Fahle ve ark. altı tane ticari viral DNA izolasyon kitini karşılaştırdıkları çalışmalarında (133) çeşitli klinik numunelere belli oranlarda CMV DNA eklemiştir ve ticari kitlerin performansları bu numuneler üzerinden değerlendirmişlerdir. Altı ticari kitin tamamı 200 plak oluşturan birim (pfu)/ml üzerindeki tüm virüs konsantrasyonlarını saptamıştır. Buna karşın iki tane kitin alt saptama sınırı değeri 4 ve 0.4 pfu/ml olarak bulunmuş, diğer dört kit bu seviyeleri saptayamamıştır. Buradan da anlaşılacağı üzere manuel ticari kitlerin farklı duyarlılıkta olması en önemli dezavantajlarıdır. Klinik tanı amacıyla kullanılacak manuel kitlerin her bir çalışma için validasyon testlerinin ardından sonuçların onaylanması gerektiği unutulmamalıdır.

Rutin laboratuvar pratiğine kPZR platformlarının girmesiyle birlikte manuel kitler yerini otomatik izolasyon cihazlarına bırakmışlardır. Bu sistemlerin doğruluk ve tekrarlanabilirlik performansları daha yüksek ve platformlar arası sonuçlar daha uyumludur. Tsai ve ark. CMV DNA yükünü saptamak amacıyla klinik laboratuvarlarda geniş kullanım alanı bulan iki farklı otomatik izolasyon ve bu izolasyon sistemlerine bağlı gerçek zamanlı kPZR platformunun performans özelliklerini, alınan sonuçların uyumunu ve bu platformların iş akışını karşılaştırmışlardır (134). Sonuçta alt sınır saptama değerleri, iş akışları ve sonuç verme süreleri farklı olsa da DSÖ standardizasyonu dikkate alındığında bu iki platform arasında sonuçlar uyumlu olarak bulunmuştur. Sabatier ve ark. viral nükleik asit izolasyon işleminin yeni nesil dizileme yöntemi ile alınan okuma sonuçlarına etkisini araştırmak için bir adet manuel viral nükleik asit izolasyon kiti ve iki adet de otomatik viral nükleik asit izolasyon platformunu değerlendiren bir çalışma yapmışlardır (135). Bu çalışmada klinik örneklerle birlikte yapay örnekler de oluşturularak çalışılmıştır. Her üç izolasyon yöntemi tüm örnekler üzerine uygulanmış ve elde edilen viral nükleik asit izolatları ileri işleme alınmıştır. Manuel izolasyon kiti ile yapılan izolasyon işlemi ile alınan okuma oranları diğer izolasyon işlemlerine oranla daha az bulunmuştur. Ayrıca yapay olarak üretilen numunenin manuel kit ile izolasyonunda kontaminasyon oranının anlamlı seviyede yüksek olduğu saptanmıştır. Hiç kuşkusuz, bu sonucun ortaya çıkmasında manuel kitlerin performans özelliklerinin farklı olması, kitlerin taşıma ve kullanım yöntemlerinin değişiklik göstermesi, deney esnasında yapılan manipülasyonlar ile kontaminasyona açık olması gibi faktörler başlıca rolü oynamaktadır. Tüm bunlarla birlikte, her bir klinik ve araştırma laboratuvarı en uygun nükleik asit izolasyon yöntemini kendi ihtiyaçları doğrultusunda seçerek kullanmalıdır.

Çalışmamızda 142 plazma numunesinin 65 (%45,7) tanesinde hedef bölge amplifikasyonu sağlanamamıştır. Yukarıda anlatılan bilimsel çalışmalar ışığında, şüphesiz ki, ticari manuel kit ile yapılan DNA izolasyon deneyi esnasında kayıplar olmuştur. Nitekim, negatif sonuç alınan 65 hasta için aynı DNA izolatları ile PZR deneyi tekrar edilmiş ve tekrar sonuçlarının hiçbirinde pozitiflik saptanmamıştır. Bu bulgu ise izolasyon işlemi ve öncesinde viral DNA kayıplarının olma ihtimalini desteklemektedir. Aynı izolattan PZR tekrarı yerine, en baştan aynı plazmadan izolasyon işleminin tekrar yapılması ve elde edilen bu yeni izolatlar ile PZR deneyinin

tekrarlanması daha akılcı görünmektedir. Bahsedilen varsayımların önüne geçmek için viral DNA izolasyon işlemi sonrasında tüm izolatlar için elde edilen DNA miktarı ve saflığı ölçülmelidir. Yaptığımız çalışmada, her ne kadar yöntemsel bir çalışma olmasa da izolasyon deneyleri sonrasında DNA miktarının ve saflığının ölçülmemiş olması bu çalışmanın önemli kısıtlılıklarından birini oluşturmaktadır.

Viral DNA izolasyon deneylerinin tamamlanmasının ardından yuvalanmış PZR çalışmalarına başlanmıştır. Geleneksel yöntem ile yaptığımız bu deneylerin uzun sürmesi, emek yoğun olması, kontaminasyona açık olması, hedef bölge çoğaltma işleminden sonra görüntüleme ihtiyacının olması ve duyarlılığın düşük olması gibi dezavantajları olsa da amplifikasyon ürünlerinin dizi analizinde kullanılacağı için bu yöntem uygulanmıştır. Ramamurthy ve ark. gerçek zamanlı PZR ile geleneksel PZR karşılaştırmak için 147 BOS örneğini kullandıkları bir çalışma yapmışlardır. Bu çalışmada SSS tutulumu yapan HSV-1, HSV-2, VZV, CMV ve EBV virüslerinin saptanması amaçlanmıştır. Genel olarak, tüm numune setinde gerçek zamanlı PZR 88 (%59,9) pozitif sonuç verirken, geleneksel PZR 6 (%4,1) pozitif sonuç vermiştir. Çalışmamızda, gerçek zamanlı kPZR ile virüs yükü 1000 IU/ml ve üzerinde olan 142 plazma numunesinden 77 tanesi pozitif bulunmuş ve yuvalanmış PZR duyarlılığımız %54,2 olarak literatüre göre beklendiği gibi sonuçlanmıştır.

PZR deneylerinin duyarlılığını birçok faktör etkilemektedir (136). Bunlar arasında deneyin karışım içeriğini oluşturan bileşikler ve DNA replikasyonunu gerçekleştiren enzimin aktivitesi öne çıkmaktadır. Çalışmamızda, kullanıma hazır karışım ile deneylerin yapılmış olması reaksiyon bileşenlerinin optimize edilmesini kolaylaştırmıştır. Deneylerde sadece primerler ve kalıp DNA hacimleri dışardan eklenerek kullanıma hazır karışım ile PZR optimize edilmiştir. PZR deneylerine dahil edilen kalıp DNA miktarı ve saflığının çalışma öncesinde ölçülmemiş olması bu çalışmanın kısıtlılıklarından biridir. Çalışmamız, bir yöntem çalışması olmadığından dolayı DSÖ referans standartları temel alınarak izolasyon ve PZR duyarlık deneyleri yapılmamıştır. Bunun yerine duyarlılık çalışmaları, DSÖ standartları ile uyumlu olan ticari gerçek zamanlı kPZR platformu temel alınarak yapılmıştır ve duyarlılık oranı %54,2 olarak bulunmuştur.



Plazma örneklerinin ve hasta bilgilerinin ileriye dönük olarak toplanmış olması, çalışmaya katılan hasta sayısının yüksek olması, deney çalışmalarının aynı malzemeler ve gereçler kullanılarak sabit kullanıcılar tarafından gerçekleştirilip yorumlanması da çalışmamızın güçlü yanlarını oluşturmaktadır.

Çalışmamızda toplam 142 plazma numunesinden 77'sinde (%54,2) hedef bölgede dizi verisi elde edilmiştir. Bu 77 dizinin analizinde ise iki (%2,6) hastada direnç ilişkili mutasyon saptanmıştır. Bu mutasyonlar M460V ve A594V şeklindedir. Çalışmamızda saptadığımız bu mutasyonlar tüm gansiklovir direncini %80'inden sorumlu olan yedi mutasyondan ikisidir (4, 25, 72).

Literatürde antiviral ilaç direnç oranları hasta gruplarına bağlı olarak %0 ile %10 arasında değişmektedir (8). Hantz ve arkadaşlarının Fransa'da 346 nakil hastası ile yaptıkları geniş katılımlı çalışmada gansiklovir direncinden sorumlu olan *UL97* ve *UL54* gen bölgelerindeki mutasyonlar araştırılmıştır (73). Çalışmaya dahil edilme kriteri etkin tedaviye rağmen 21. Günde kanda CMV DNA saptanması olarak belirlenmiştir. Sonuçta 346 nakil hastasının 37'sinde klinik direnç düşünülmüş ve bunların 18'inde Sanger dizileme yöntemiyle direnç ilişkili mutasyon gösterilirken, 19'unda gösterilememiştir. Çalışmadaki toplam direnç oranı %5,2 (18/346) olduğu görülmektedir. Bu oran çalışmamızda bulduğumuz direnç oranının iki katıdır. Şüphesiz ki, bu durumun muhtemel sebeplerinin başında çalışmamızda sadece *UL97* gen bölgesinin ATP bağlayan alt birimine ait 287 aminoasit içeren kısmının değerlendirilmiş olması gelmektedir. Dolayısıyla, çalışmamıza katılan hastalarda hedeflenen alanların dışında kalan hem *UL97* hem de *UL54* gen bölgelerindeki mutasyonlardan kaynaklı direnç ortaya çıkmış olabilir. Her ne kadar tüm gansiklovir direncinin %80'ine sebep olan gen bölgesi çalışmamızda araştırılmış olsa da direnç ilişkili tüm genlerin analiz edilmemiş olması çalışmamızın kısıtlılığını oluşturmaktadır. Çalışmamıza dahil edilen hastaların gansiklovir direnciyle ilişkili tüm genlerin analizine devam edilmesi gerekmektedir. Hantz ve arkadaşlarının çalışmalarında genotipik testlerin yanında fenotipik testlerin de uygulanmış olması yanlış negatif sonuçların önüne geçerek bu çalışmanın etki gücünü artırmıştır. Ancak yine de klinik olarak direnç beklenen 19 hastada virolojik direnç gösterilememiştir. Bu durumun sebepleri ise kanda ve hedef dokudaki ilaç konsantrasyonunun yeterli düzeye

ulaşamamış olması, in vitro ilaca maruziyet süresinin kısa olması veya direnç testlerinin belli sayının altındaki dirençli popülasyonu saptayamamasıyla açıklanmaktadır (100).

Ülkemizde gansiklovir direnciyle ilgili yapılan araştırmalar aynı merkezden yapılan iki çalışma ile sınırlı kalmaktadır. Bunlardan ilki, Delice ve ark. 30 immün yetmezliği bulunan hastanın geriye dönük katılımıyla yaptıkları çalışmadır (137). Bu hastalarda elde edilen CMV DNA'larında gansiklovir direnci ile ilişkili mutasyonların saptanması için *UL97* gen bölgesinde 420-664 kodonlarını, *UL54* gen bölgesinde ise 261-588 ve 740-987 kodonlarını kapsayan gen bölgelerinin dizi analizini yapmışlardır. Sonuçta bir hastada *UL97* gen bölgesinde M460V mutasyonu ve bir hastada ise *UL54* gen bölgesinde L802M mutasyonunun varlığını göstermişlerdir. Buradan da anlaşılacağı üzere M460V mutasyonu tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de yaygın görülmektedir. Söz konusu çalışmadaki toplam mutasyon oranı %6,6 (2/30) olarak bulunmuştur. Bu oranın çalışmamızdaki orandan fazla olması daha fazla gen bölgelerinin analiz edilmiş olmasından kaynaklanabilir. Ancak gansiklovir direnciyle ilişkili tüm genlerin analiz edilmemiş olması bu çalışmanın, bizim çalışmamızda olduğu gibi, eksikliklerinden biridir. Aynı merkezden yapılan diğer çalışmada ise Coşkun ve arkadaşları 49 hastanın katılımıyla *UL97* gen bölgesindeki 420-664 arası kodonları gansiklovir direnci açısından değerlendirmişlerdir. Bu çalışmada gansiklovir direnci ile ilişkili M460I, C592G ve C670S mutasyonlarını saptamışlardır. Direnç saptama oranı bu çalışmada %6,1 olarak bulunmuştur. Bu çalışmadaki direnç oranının bizim çalışmamıza göre yüksek olmasının sebebi direnç analizi yapılan hastaların seçilme kriterlerindeki farklılıklardan kaynaklanmış olabilir. Çalışmamıza dahil edilen hasta sayısı, ülkemizde yapılan iki çalışmadan da fazladır. Bu durum çalışmamızın etki gücünü artırmaktadır.

Çalışmamızda direnç saptadığımız hastaları değerlendirecek olursak, M460V mutasyonu üç yaşında, etkin tedaviye yanıtız erkek hastada saptanmıştır. Bu mutasyon sonucunda gansiklovir tedavisine orta düzeyde direnç ortaya çıkmıştır. Literatürde bu mutasyonun fenotipik olarak değerlendirildiği çalışmalar aşağıda ele alınmıştır.

Smith ve ark. klinik CMV izolatları ile yaptıkları deneyler, ilk çalışmalardan birisidir (138). *UL97* ve *UL54* gen bölgelerindeki mutasyonlarının antiviral direnç oluşturmadaki önemini araştırmak için, gansiklovire dirençli 28 klinik CMV izolatının fenotipik (PRA yöntemi) ve genotipik karakterizasyonunu yapmışlardır. Fenotipik karakterizasyon sonucu iki CMV suşunda *UL97* gen bölgesinde izole M460V mutasyonu bulmuşlardır. Bu suşlar, kontrol amacıyla kullanılan duyarlı suşla karşılaştırıldıklarında, gansiklovire karşı orta düzeyde dirençli bulunmuşlardır.

Chou, 2010 yılında, gansiklovir tedavisi altında olan hastalardan izole ettiği CMV suşlarının *UL97* gen bölgesinde saptanan polimorfizmlerin gansiklovir direncine olan etkisini araştırmıştır (110) ve rekombinant fenotiplendirme yöntemiyle bu çalışmayı gerçekleştirmiştir. Bu çalışmada M460V mutasyonu olan klinik suşlarda standart laboratuvar suşuna oranla yaklaşık dokuz katlık bir direnç artışı gösterilmiştir.

Drew ve ark. yaptıkları çalışmada ise 16 klinik izolatın anti-CMV ilaçlara karşı olan duyarlılığı fenotipik ve genotipik olarak araştırılmıştır (89). Bu 16 izolatın bir tanesinde M460V mutasyonu saptanmış ve standart duyarlı suş ile karşılaştırıldığında, bu mutant suşta gansiklovire karşı yaklaşık sekiz kat direnç artışı olduğu gösterilmiştir.

Yukarıda değinilen bilimsel çalışmalar ışığında M460V mutasyonu olan klinik CMV suşlarında gansiklovire orta düzeyde (5-15 kat) direncin ortaya çıktığı görülmektedir. Güncel literatürde direnç saptanan hastaların tedavi yönetimi için rehberlerde kesin öneriler bulunmamaktadır (8). Bununla birlikte, Kotton ve ark. göre antiviral direnç testleri sonucunda gansiklovir tedavisine karşı beş kat ve üzerindeki direnç artışında tedavi değişikliğine gidilmelidir (139). Çalışmamızda da literatüre uygun olarak M460V mutasyonu saptanan hastanın yönetiminde gansiklovir tedavisi kesilerek yerine foskarnet ile devam edilmiş ve beklenen klinik ve virolojik yanıt görülmüştür. Ülkemizde CMV tedavisinde kullanılan ilaçlara fenotipik ya da genotipik direnç çalışmaları oldukça sınırlıdır. Yüksek hasta sayısı ile yapılan bu çalışmamızda, ileriye dönük olarak, gansiklovir tedavisine karşı direnç saptanması ve araştırma amacıyla da olsa tedaviye yol gösterici olması çalışmamızın güçlü yanlarından birini oluşturmaktadır.

Çalışmamızda gansiklovir direnciyle ilişkili ikinci saptanan mutasyon, A594V, 14 yaşındaki kadın hastada görülmüştür. Literatüre bakılacak olursa; Chou ve ark. *UL97* protein kinaz geninin 591 ila 603 kodonlarındaki mutasyonların sebep olduğu gansiklovir direncinin etki düzeyini araştırmışlardır (140). Bu çalışmada A594V mutasyonunun gansiklovir tedavisine karşı 6,6 katlık dirence sebep olduğu gösterilmiştir. Drouot ve ark., gansiklovir direnci ile ilişkili çoklu mutasyon saptadıkları bir HKHN vakası yayınlamışlardır (141). Bu vakada saptanan mutasyonlardan biri de *UL97* genindeki A594V mutasyonudur. Yaptıkları fenotipik direnç analizinde söz konusu mutasyonun gansiklovir tedavisine karşı yaklaşık 6 katlık direnç artışına sebep olduğunu göstermişlerdir. Drew ve ark. yaptıkları çalışmada ise 16 klinik izolatin anti-CMV ilaçlara karşı olan duyarlılığı fenotipik ve genotipik olarak araştırılmıştır (89). Bir klinik izolatta A594V mutasyonu saptanmış ve standart duyarlı suş ile karşılaştırıldığında, bu mutant suşta gansiklovire karşı yaklaşık 10 kat direnç artışı olduğu gösterilmiştir.

Klinik izolatlar üzerinde yapılan fenotipik çalışmalar, A594V mutasyonunun orta düzeyde (5-15 kat) gansiklovir direncine sebep olduğunu göstermektedir. Yukarıda değinildiği üzere güncel rehberlerde dirençli CMV enfeksiyonlarının yönetiminde kanıt düzeyinde öneri bulunmamaktadır (8). Bunun yerine uzman görüş önerileri bulunmaktadır (25). Çalışmamızda ilgili mutasyonun saptandığı hastada ağızdan valgansiklovir tedavisi kesilmiş ve damardan gansiklovir tedavisi başlanmıştır. Literatür verileri göz önüne alınarak hastaya, geçirilmiş CMV pnömonisinden dolayı, damar içi insan immün globülin (IVIG) tedavisi de eklenmiştir. Hasta bu süreçte etkin tedaviye klinik yanıtızsızlık kriterlerini sağlasa da geçmiş tedaviler ve hastaya ait konak faktörler göz önünde bulundurularak gansiklovir tedavi dozu artırılarak devam edilmiştir. Hastanın plazmasında CMV DNA yükü üç ay sonra 1000 IU/ml altına inmiştir. Takip kontrol tetkiklerinde düşük düzey virüs yükü izlenmeye devam edilmektedir.

Bu hasta özelinde, medikal tedavi dışında, hastanın CMV'ye karşı özgül hücresel yanıtı, altta yatan immün yetmezlik sebebi ve organ tutulumunun seviyesi gibi birçok faktörün CMV enfeksiyonunun gidişatını etkilediği görülmektedir. Literatür incelenecek olursa, gansiklovir tedavisinin kullanılmadığı dönemde Quinnan

ve ark. HKHN sonrasında CMV enfeksiyonu olan 43 hastayı ele alan bir çalışma yapmışlardır (142). Tüm hastalarda enfeksiyon başlamadan önce CMV'ye özgül sitotoksik lenfosit aktivitesinin düşük veya hiç olmadığını saptamışlardır. Hayatta kalan hastaların tümünde CMV'ye özgül sitotoksik yanıt gelişirken, ölümcül enfeksiyonu olan sadece iki hastada düşük düzeyde CMV'ye özgül sitotoksik yanıt olduğunu göstermişlerdir. Bu çalışmadan da anlaşılacağı üzere, medikal tedavi almayan hastalarda da etkene özgül kazanılmış immün yanıt sayesinde enfeksiyonun iyileşmesi mümkün görünmektedir.

Reusser ve ark. HKHN alıcılarında, CMV'ye özgül sitotoksik T lenfositlerin CMV hastalığından koruması üzerine çalışma yapmışlardır (143). Bu çalışma 20 nakil vericisi ve alıcısı dahil edilerek yapılmıştır. Nakil alıcısı hastalardan birinci, ikinci ve üçüncü aylarda periferik kandan alınan T lenfositlerin CMV'ye olan hücresel yanıtını değerlendirmişlerdir. Nakil sonrasında on hastada tüm aylarda etkene özgül T hücre yanıtı saptanmıştır. Bu on hastanın hiçbirisinde CMV hastalığı gelişmezken, nakil sonrası CMV'ye özgül sitotoksik T hücre yanıtı saptanmayan on hastanın altısı CMV pnömonisi nedeni ile kaybedilmiştir. Bu çalışma, etkene özgül hücresel immün yanıtın restorasyonunun gecikmesi sonucunda CMV hastalığı ve ölümlerin olabileceğini göstermektedir.

Einsele ve ark. dört haftalık etkin medikal tedaviye yanıt vermeyen yedi CMV hastasına, *in vitro* olarak CMV antijenlerine karşı duyarlılaştırılmış sitotoksik T hücresi transferi yapmışlardır (144). Hastaların tamamında ortanca 20 günde etkin virolojik yanıt alındığını saptamışlardır. Ayrıca bu çalışmada transfer edilen T hücrelerinin nakil alıcılarında çoğalmasını da araştırmışlardır. Transferden ortanca 11 gün sonra 6 hastada CMV'ye özgül T hücresi proliferasyonunu göstermişlerdir. T hücre proliferasyonu gelişmeyen hastada ise yoğun immün baskılayıcı tedavi uygulanması söz konusudur. Güncel rehberler, adaptif T hücre tedavisi denilen bu uygulamayı, nakil sonrası medikal tedaviye yanıtızsız CMV enfeksiyonu olan hastalarda uygulanmasını orta kanıt seviyesinde tavsiye etmektedir (8, 25). Bu tedavi yöntemi üzerinde klinik araştırmalar devam etmektedir.

Literatürden elde edilen bu bilgilerden anlaşılacağı üzere, CMV enfeksiyonlarının yönetiminde medikal tedaviyle birlikte özellikle hücresel immün

yanıtın restorasyonu hayati öneme sahiptir. Çalışmamızda A594V mutasyonu saptanan hastada böyle bir yaklaşım sergilenmiştir. Aslında, genotipik olarak direnç varlığı gösterilmiş CMV enfeksiyonlarının profilaksisi ve önleyici tedavi yaklaşımlarında gerçek zamanlı kPZR ile CMV DNA yükü takibine ek olarak CMV'ye özgül hücresel immün yanıt ve hasta plazmasındaki ilaç düzeyi takibi de düşünülmelidir. Ayrıca bu hastada CMV reaktivasyonu ile gansiklovir dirençli virionların vücut sıvıları ile saçılması söz konusudur. Bu dirençli virionların sebep olacağı primer enfeksiyonlar veya sekonder reenfeksiyonlar sonucu aktarılmış viral direncin ortaya çıkacağı ve gelecekte ciddi bir halk sağlığı tehdidi haline geleceği unutulmamalıdır.

Çalışmamızda yapılan analiz sonucunda 77 hastanın beşinde (%6,5), gansiklovir direncine etkisi bilinmeyen üç farklı mutasyon saptanmıştır. Bu mutasyonların görüldüğü hastaların hiçbirisi tedaviye olası ya da kesin yanıtı olmayan hasta grubunda bulunmamaktadır. Her ne kadar klinik tedaviye yanıt verseler de bu mutasyonların fenotipik yöntemlerle gansiklovir direnci açısından değerlendirilmesi gerekmektedir. Bu aşamada direnç ilişkisi bilinmeyen mutasyon saptanan hastalara ait, antiviral tedavi başlanmadan CMV DNA yükü saptanan ilk plazmalarından genotipik analiz yapılmalıdır. Bu sayede söz konusu mutasyonların aktarılmış mutasyon mu yoksa ilaca bağlı kazanılmış mutasyon mu olduğu ayrımı yapılabilir.

Söz konusu hastalardan CMV suşlarının izole edilerek fenotipik olarak bu mutasyonların gansiklovir direncine etkisi araştırılmalıdır. Kotton ve ark. göre sekansların kalite kontrolü, tekrarlanabilirliği, hastaya uygulanan tedavi öyküsü, bilinen mutasyonlara yakınlığı ve fenotipik karakterizasyonu yapılmadan bu mutasyonlar raporlanmamalıdır (25).

Dizi analizlerinin değerlendirmesinde son olarak ele alınması gereken nokta tedaviye klinik olarak yanıtı olmayan altı hasta ve olası yanıtı olmayan iki hastada herhangi bir mutasyonun saptanmamış olmasıdır. Bu durumun önemli sebeplerinden biri gansiklovir direnciyle ilişkili tüm gen bölgelerinin analiz edilmemiş olması olabilir. Ayrıca dizi analizi için kullanılan Sanger dizileme yönteminin, toplam virüs popülasyonu içinde dirençli virüs popülasyonunun belli miktarın altında olmasıyla duyarlılığının düşmesi sonucu ortaya çıkmış olabilir. Nitekim, Hantz ve ark. yaptıkları çalışmada Sanger dizileme yönteminin %25'in altındaki virüs alt popülasyonunu

saptayamadığını göstermişlerdir (6). Bunun yanında deneylerde tekrarlanabilirlik çalışmalarının yapılmamış olması da yalancı negatifliklerin ortaya çıkmasına sebep olmuş olabilir.

Sonuç olarak; tüm hasta grupları birlikte düşünüldüğünde CMV hastalığı olan hastalar ile olmayan hastalar arasında gansiklovir direnci açısından anlamlı fark bulunmamıştır ( $p=0,610$ ). Bu duruma çalışmamıza ait yukarıda değinilen kısıtlılıklar sebep olmuş olabilir. Gelecekte, söz konusu kısıtlılıkların aşılması, hasta gruplarının tek tek değerlendirilmesi ve daha çok hastanın katılımıyla yapılması gereken çalışmalara ihtiyaç vardır.

## 6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmamızda çeşitli immün yetmezlikli hasta gruplarına ait hastalarda CMV hastalığı olanlar ve olmayanlar gansiklovire direnç açısından araştırılmıştır. Çalışmamız ileriye dönük olarak 142 hastanın katılımıyla bir yıl içerisinde gerçekleştirilmiştir. Çalışmaya dahil edilen hastalara ait plazmalar toplanmış ardından viral DNA izolasyon ve yuvalanmış PZR deneyleri uygulanmıştır. Toplam 77 hastada hedef bölge amplifikasyonu saptanmış ve bu örneklerle Sanger yöntemiyle dizi analizi yapılarak genotipik direnç analizi yapılmıştır.

Analiz sonucunda iki hastada gansiklovire karşı virolojik dirençten sorumlu olan M460V ve A594V mutasyonlarının varlığı gösterilmiştir. Dirençli hastalar sırayla CMV retiniti ve CMV pnömonisi tanısı almışlardır. Bu hastaların tedavileri uygun şekillerde değiştirilmiştir.

Çalışmamızda klinik olarak tedavi yanıtısızlığı olan altı hastada ve tedaviye olası yanıtısız iki hastada herhangi bir mutasyon saptanmamıştır. Bu duruma yol açabilecek faktörler ve çözümleri tartışma bölümünde ele alınmıştır. Bu çalışma sonunda aşağıda maddeler halinde verilen önerilerin yazılması uygun görülmüştür:

- i. İki haftalık etkin anti-CMV tedaviye rağmen kandaki virüs yükü artan veya logaritmik olarak azalmayan, CMV'ye bağlı organ tutulumunda düzelme olmayan veya yeni tutulumlar ortaya çıkan her hasta gansiklovir direnci fenotipik ya da genotipik yöntemlerle araştırılmalıdır. Fenotipik direnç çalışılırken, yönteme ait kısıtlılıklar dikkate alınmalıdır. Genotipik yöntemler için de dizi analizi yapılırken direnç ilişkili olabilecek bütün gen bölgeleri analize dahil edilmelidir. Tedaviye yanıtısız hastalarda virolojik direnç saptanamazsa rehberler doğrultusunda hasta yönetimi sürdürülmeli, takip eden direnç çalışmalarıyla ilgili mutasyonun saptanabileceği unutulmamalıdır.
- ii. Gansiklovir tedavisine karşı virolojik dirençle ilişkili mutasyon saptandığında tedavi değişikliği önerilse de diğer anti-CMV ilaçların özellikle böbrek fonksiyonları üzerine olan yan etkileri bilinmektedir. Bu açıdan direnç saptanan hastalarda medikal tedaviyle birlikte



CMV'ye özgül hücrel immün yanıt takibi de yapılmalıdır. Daha geniş kapsamlı çalışmalarla etkene özgül hücrel yanıt düzeyi ile tedavi yönetimini yönlendirecek sınır değerlerin geliştirilebileceği üzerine düşünölmelidir. Ülkemizde kullanımda olmayan letermovir ve maribavir gibi anti-CMV ilaçların özellikle gansiklovir dirençli suşlar üzerine olan etkinlikleri fenotipik ve genotipik olarak araştırılmalıdır. Gansiklovir tedavisine düşük düzey virolojik direnç (2-5 kat) olan hastalarda gansiklovirin doz artırımı yapılarak kandaki ilaç düzeyi takibi ile hasta izlemi yapılabilir. Ayrıca bu yaklaşım ile medikal tedavi değışikliğı yaklaşımı kontrollü klinik çalışmalarla kıyaslanmalıdır.

- iii. DNA dizi analizi ile mutasyonlara bağıli direnç saptanan hastalardaki latent CMV suşlarının reaktivasyonu ile ilaca dirençli virionların saçılımına sebep olabileceğı akılda tutulmalıdır. Dirençli suşların primer enfeksiyona yol açabileceğı bilinmeli ve bu CMV suşları dizi analizi ile izleme alınmalıdır. Gelecekte ilaca dirençli latent CMV enfeksiyonlarının tam iyilik halinin sağlanması için yeni yaklaşımlara ihtiyaç duyulabilir.
- iv. Genotipik direnç yöntemleri uygulanırken, ilk kez saptanan mutasyonların ilaç direncine olan etkisinin fenotipik yöntemlerle belirlenmesi gerekmektedir. Bunun yapılabilmesi için hasta takibini yapan klinik hekimi ile laboratuvar hekiminin iş birliğı içerisinde olması gerekliliğı de unutulmamalıdır.

Sonuç olarak çalışmamızın verileri ışığında CMV hastalığı olan ve olmayan hastalar arasında gansiklovire karşı mutasyonlara bağıli direnç açısından anlamlı fark bulunmamıştır. Bu verilerin, hasta gruplarının bağımsız olarak incelendiğı ve daha fazla katılımcı ile diğeri kısıtlılıkları giderilmiş başkaca çalışmalar tarafından araştırılması gerekmektedir.

## 7. KAYNAKLAR

1. Coşkun A. İmmün Yetmezlikli Hastalardan Elde Edilen Sitomegalovirüs İzolatlarındaki Gansiklovir Direncinin Araştırılması. *Mikrobiyol Bul.* 2020;54(4):619-28.
2. Mocarski Jr E. Cytomegalovirus biology and replication. In “The Human Herpesviruses”(B. Roizman, RJ Whitley, and C. Lopez, Eds.). Raven Press, New York; 1993.
3. Ustaçelebi ŞM, Abacıoğlu H, Badur SM. Klinik ve Tanısal Viroloji. Güneş Kitabevi, Ankara. 2004:246-7.
4. Komatsu TE, Pikis A, Naeger LK, Harrington PR. Resistance of human cytomegalovirus to ganciclovir/valganciclovir: a comprehensive review of putative resistance pathways. *Antiviral research.* 2014;101:12-25.
5. Us A, Ergünay K. Moleküler, Klinik ve Tanısal Viroloji. Ankara: Ankara Bilimsel Tıp Yayınevi. 2012.
6. Hantz S, Garnier-Geoffroy F, Mazon M-C, Garrigue I, Merville P, Mengelle C, et al. Drug-resistant cytomegalovirus in transplant recipients: a French cohort study. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2010;65(12):2628-40.
7. Hakki M, Aitken SL, Danziger-Isakov L, Michaels MG, Carpenter PA, Chemaly RF, et al. American Society for Transplantation and Cellular Therapy Series:# 3—Prevention of cytomegalovirus infection and disease after hematopoietic cell transplantation. *Transplantation and Cellular Therapy.* 2021;27(9):707-19.
8. Ljungman P, de la Camara R, Robin C, Crocchiolo R, Einsele H, Hill JA, et al. Guidelines for the management of cytomegalovirus infection in patients with haematological malignancies and after stem cell transplantation from the 2017 European Conference on Infections in Leukaemia (ECIL 7). *The Lancet infectious diseases.* 2019;19(8):e260-e72.
9. Ribbert H. Über protozoenartige Zellen in der Niere eines syphilitischen Neugeborenen und in der Parotis von Kindern. *Zbl Allg Pathol.* 1904;15:945-8.
10. Löwenstein C. Über protozoenartige Gebilde in den Organen von Kindern. *Zbl allg Path path Anat.* 1907;18:513.
11. Wyatt JP, Saxton J, Lee R, Pinkerton H. Generalized cytomegalic inclusion disease. *Journal of Pediatrics.* 1950;36(3):271-94.
12. Minder WH. [Etiology of cytomegaly in infants]. *Schweiz Med Wochenschr.* 1953;83(49):1180-2.
13. Weller TH, Macauley J, Craig J, Wirth P. Isolation of intranuclear inclusion producing agents from infants with illnesses resembling cytomegalic inclusion disease. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine.* 1957;94(1):4-12.
14. Weller TH. Review. Cytomegaloviruses: the difficult years. *J Infect Dis.* 1970;122(6):532-9.

15. Wallace PR, Janet WH, Samuel W, Horace CT, Robert JH. Cytopathogenic agent resembling human salivary gland virus recovered from tissue cultures of human adenoids. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 1956;92(2):418-24.
16. Krech U, Juno M, Jung F. Cytomegalo-virus infections of man. *Cytomegalo-virus infections of man*. 1971.
17. Reynolds DW, Stagno S, Hosty TS, Tiller M, Alford Jr CA. Maternal cytomegalovirus excretion and perinatal infection. *New England Journal of Medicine*. 1973;289(1):1-5.
18. Klemola E, Kääriäinen L. Cytomegalovirus as a possible cause of a disease resembling infectious mononucleosis. *British medical journal*. 1965;2(5470):1099.
19. Diosi P, Moldovan E, Tomescu N. Latent cytomegalovirus infection in blood donors. *Br Med J*. 1969;4(5684):660-2.
20. Meyers JD, Flournoy N, Donnall Thomas E. Risk factors for cytomegalovirus infection after human marrow transplantation. *Journal of Infectious Diseases*. 1986;153(3):478-88.
21. Peterson PK, BALFOUR JR HH, Marker SC, Fryd DS, Howard RJ, Simmons RL. Cytomegalovirus disease in renal allograft recipients: a prospective study of the clinical features, risk factors and impact on renal transplantation. *Medicine*. 1980;59(4):283-300.
22. Gallant JE, Moore RD, Richman DD, Keruly J, Chaisson RE, Group ZES. Incidence and natural history of cytomegalovirus disease in patients with advanced human immunodeficiency virus disease treated with zidovudine. *Journal of Infectious Diseases*. 1992;166(6):1223-7.
23. Cheng Y-C, Huang E-S, Lin J-C, Mar E-C, Pagano JS, Dutschman GE, et al. Unique spectrum of activity of 9-[(1, 3-dihydroxy-2-propoxy) methyl]-guanine against herpesviruses in vitro and its mode of action against herpes simplex virus type 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1983;80(9):2767-70.
24. Chrisp P, Clissold SP. Foscarnet. A review of its antiviral activity, pharmacokinetic properties and therapeutic use in immunocompromised patients with cytomegalovirus retinitis. *Drugs*. 1991;41(1):104-29.
25. Kotton CN, Kumar D, Caliendo AM, Huprikar S, Chou S, Danziger-Isakov L, et al. The Third International Consensus Guidelines on the Management of Cytomegalovirus in Solid-organ Transplantation. *Transplantation*. 2018;102(6):900-31.
26. Yang H, Datema R. Prolonged and potent therapeutic and prophylactic effects of (S)-1-[(3- hydroxy-2-phosphonylmethoxy)propyl]cytosine against herpes simplex virus type 2 infections in mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1991;35(8):1596-600.
27. Murphy E, Shenk TE. Human cytomegalovirus genome. *Human cytomegalovirus*. 2008:1-19.
28. Schleiss MR. Cytomegalovirus. *Maternal Immunization: Elsevier*; 2020. p. 253-88.

29. Roizman B, Whitley RJ, Lopez C. The human herpesviruses: Raven Press (ID); 1993.
30. Spaete RR, Gehrz RC, Landini MP. Human cytomegalovirus structural proteins. *Journal of General Virology*. 1994;75(12):3287-308.
31. Lee JY, Irmiere A, Gibson W. Primate cytomegalovirus assembly: evidence that DNA packaging occurs subsequent to B capsid assembly. *Virology*. 1988;167(1):87-96.
32. Gibson W. Protein counterparts of human and simian cytomegaloviruses. *Virology*. 1983;128(2):391-406.
33. Lawrence G, Chee M, Craxton M, Gompels U, Honess R, Barrell B. Human herpesvirus 6 is closely related to human cytomegalovirus. *Journal of Virology*. 1990;64(1):287-99.
34. Rudolph S-A, Kühn JE, Korn K, Braun RW, Jahn G. Prokaryotic expression of the major capsid protein of human cytomegalovirus and antigenic cross-reactions with herpes simplex virus type 1. *Journal of general virology*. 1990;71(9):2023-31.
35. Braun DK, Batterson W, Roizman B. Identification and genetic mapping of a herpes simplex virus capsid protein that binds DNA. *Journal of virology*. 1984;50(2):645-8.
36. Britt W, editor Recent advances in the identification of significant human cytomegalovirus-encoded proteins. *Transplantation proceedings*; 1991.
37. Geballe AP, Leach FS, Mocarski ES. Regulation of cytomegalovirus late gene expression: gamma genes are controlled by posttranscriptional events. *Journal of virology*. 1986;57(3):864-74.
38. Van der Bij W, Schirm J, Torensma R, Van Son W, Tegzess AM, The T. Comparison between viremia and antigenemia for detection of cytomegalovirus in blood. *Journal of clinical microbiology*. 1988;26(12):2531-5.
39. Charpentier B, Michelson S, Martin B. Definition of human cytomegalovirus-specific target antigens recognized by cytotoxic T cells generated in vitro by using an autologous lymphocyte system. *Journal of immunology (Baltimore, Md: 1950)*. 1986;137(1):330-6.
40. Compton T. An immortalized human fibroblast cell line is permissive for human cytomegalovirus infection. *Journal of virology*. 1993;67(6):3644-8.
41. Marshall GS, Rabalais GP, Stout GG, Waldeyer SL. Antibodies to recombinant-derived glycoprotein B after natural human cytomegalovirus infection correlate with neutralizing activity. *Journal of Infectious Diseases*. 1992;165(2):381-4.
42. Marshall GS, Ricciardi RP, Rando RF, Puck J, Ge R, Plotkin SA, et al. An adenovirus recombinant that expresses the human cytomegalovirus major envelope glycoprotein and induces neutralizing antibodies. *Journal of Infectious Diseases*. 1990;162(5):1177-81.
43. Simpson JA, Chow JC, Baker J, Avdalovic N, Yuan S, Au D, et al. Neutralizing monoclonal antibodies that distinguish three antigenic sites on human cytomegalovirus

glycoprotein H have conformationally distinct binding sites. *Journal of virology*. 1993;67(1):489-96.

44. Crough T, Khanna R. Immunobiology of human cytomegalovirus: from bench to bedside. *Clinical microbiology reviews*. 2009;22(1):76-98.

45. Alonso-Álvarez S, Colado E, Moro-García MA, Alonso-Arias R. Cytomegalovirus in haematological tumours. *Frontiers in Immunology*. 2021;12:703256.

46. Karki G. Cytomegalovirus (CMV)-Replication, Transmission, Pathogenesis, Diseases, diagnosis and treatment 2020 [cited 2023 June 16]. Available from: <https://www.onlinebiologynotes.com/cytomegalovirus-cmv-replication-transmission-pathogenesis-diseases-diagnosis-and-treatment/>.

47. Ataman S, Colak D, Guenseren F, Senol Y, Colak T, Aktekin MR, et al. Investigation of cytomegalovirus seroepidemiology in Antalya with a population-based cross-sectional study and review of related data in Turkey. *Mikrobiyoloji Bulteni*. 2007;41(4):545-55.

48. Fowler KB, Stagno S, Pass RF. Interval between births and risk of congenital cytomegalovirus infection. *Clinical infectious diseases*. 2004;38(7):1035-7.

49. Klein JO, Remington JS. *Infectious diseases of the fetus and newborn infant*: WB Saunders; 1983.

50. Ljungman P, Boeckh M, Hirsch HH, Josephson F, Lundgren J, Nichols G, et al. Definitions of cytomegalovirus infection and disease in transplant patients for use in clinical trials. *Clinical Infectious Diseases*. 2016:ciw668.

51. Sissons J, Carmichael A. Clinical aspects and management of cytomegalovirus infection. *Journal of Infection*. 2002;44(2):78-83.

52. Ang C, Jacobs B, Brandenburg A, Laman J, Van Der Meché F, Osterhaus A, et al. Cross-reactive antibodies against GM2 and CMV-infected fibroblasts in Guillain-Barré syndrome. *Neurology*. 2000;54(7):1453-8.

53. Gaytant MA, Steegers EA, Semmekrot BA, Merkus HM, Galama JM. Congenital cytomegalovirus infection: review of the epidemiology and outcome. *Obstetrical & gynecological survey*. 2002;57(4):245-56.

54. Gandhi MK, Khanna R. Human cytomegalovirus: clinical aspects, immune regulation, and emerging treatments. *The Lancet infectious diseases*. 2004;4(12):725-38.

55. Boppana SB, Pass RF, Britt WJ, Stagno S, Alford CA. Symptomatic congenital cytomegalovirus infection: neonatal morbidity and mortality. *The Pediatric infectious disease journal*. 1992;11(2):93-9.

56. Razonable RR, Humar A. Cytomegalovirus in solid organ transplant recipients—Guidelines of the American Society of Transplantation Infectious Diseases Community of Practice. *Clinical transplantation*. 2019;33(9):e13512.

57. Hassan-Moosa R, Chinappa T, Jeena L, Visser L, Naidoo K. Cytomegalovirus retinitis and HIV: Case reviews from KwaZulu-Natal Province, South Africa. *SAMJ: South African Medical Journal*. 2017;107(10):843-6.

58. Whitley RJ, Jacobson MA, Friedberg DN, Holland GN, Jabs DA, Dieterich DT, et al. Guidelines for the treatment of cytomegalovirus diseases in patients with AIDS in the era of potent antiretroviral therapy: recommendations of an international panel. *Archives of internal medicine*. 1998;158(9):957-69.
59. Ong DS, Chong G-LM, Chemaly RF, Cremer OL. Comparative clinical manifestations and immune effects of cytomegalovirus infections following distinct types of immunosuppression. *Clinical Microbiology and Infection*. 2022.
60. Kotton C. CMV: prevention, diagnosis and therapy. *American Journal of Transplantation*. 2013;13:24-40.
61. Schröeder R, Michelon T, Fagundes I, Bortolotto A, Lammerhirt E, Oliveira J, et al., editors. Antigenemia for cytomegalovirus in renal transplantation: choosing a cutoff for the diagnosis criteria in cytomegalovirus disease. *Transplantation proceedings*; 2005: Elsevier.
62. Fryer JF, Heath AB, Anderson R, Minor PD, Organization WH, Group CS, et al. Collaborative study to evaluate the proposed 1st [first] WHO international standard for human cytomegalovirus (HCMV) for nucleic acid amplification (NAT)-based assays. World Health Organization; 2010.
63. Hayden R, Sun Y, Tang L, Procop G, Hillyard D, Pinsky B, et al. Progress in quantitative viral load testing: variability and impact of the WHO quantitative international standards. *Journal of Clinical Microbiology*. 2017;55(2):423-30.
64. Hayden R, Yan X, Wick M, Rodriguez A, Xiong X, Ginocchio C, et al. Factors contributing to variability of quantitative viral PCR results in proficiency testing samples: a multivariate analysis. *Journal of clinical microbiology*. 2012;50(2):337-45.
65. Kraft CS, Armstrong WS, Caliendo AM. Interpreting quantitative cytomegalovirus DNA testing: understanding the laboratory perspective. *Clinical infectious diseases*. 2012;54(12):1793-7.
66. Delforge M-L, Desomberg L, Montesinos I. Evaluation of the new LIAISON® CMV IgG, IgM and IgG Avidity II assays. *Journal of Clinical Virology*. 2015;72:42-5.
67. Seed CR, Piscitelli LM, Maine GT, Lazzarotto T, Doherty K, Stricker R, et al. Validation of an automated immunoglobulin G-only cytomegalovirus (CMV) antibody screening assay and an assessment of the risk of transfusion transmitted CMV from seronegative blood. *Transfusion*. 2009;49(1):134-45.
68. Preiksaitis JK, Sandhu J, Strautman M. The risk of transfusion-acquired CMV infection in seronegative solid-organ transplant recipients receiving non-WBC-reduced blood components not screened for CMV antibody (1984 to 1996): experience at a single Canadian center. *Transfusion*. 2002;42(4):396-402.
69. Meesing A, Razonable RR. New developments in the management of cytomegalovirus infection after transplantation. *Drugs*. 2018;78:1085-103.
70. El Helou G, Razonable RR. Letermovir for the prevention of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients: an evidence-based review. *Infection and drug resistance*. 2019:1481-91.

71. Frange P, Leruez-Ville M. Maribavir, brincidofovir and letermovir: Efficacy and safety of new antiviral drugs for treating cytomegalovirus infections. *Médecine et Maladies Infectieuses*. 2018;48(8):495-502.
72. Lurain NS, Chou S. Antiviral drug resistance of human cytomegalovirus. *Clinical microbiology reviews*. 2010;23(4):689-712.
73. Hantz S, Garnier-Geoffroy F, Mazeron M-C, Garrigue I, Merville P, Mengelle C, et al. Drug-resistant cytomegalovirus in transplant recipients: a French cohort study. *Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2010;65(12):2628-40.
74. Razonable RR, editor *Antiviral drugs for viruses other than human immunodeficiency virus*. Mayo Clinic Proceedings; 2011: Elsevier.
75. Asberg A, Humar A, Rollag H, Jardine AG, Mouas H, Pescovitz MD, et al. Oral valganciclovir is noninferior to intravenous ganciclovir for the treatment of cytomegalovirus disease in solid organ transplant recipients. *American Journal of Transplantation*. 2007;7(9):2106-13.
76. Razonable RR. Drug-resistant cytomegalovirus: clinical implications of specific mutations. *Current opinion in organ transplantation*. 2018;23(4):388-94.
77. Reusser P, Einsele H, Lee J, Volin L, Rovira M, Engelhard D, et al. Randomized multicenter trial of foscarnet versus ganciclovir for preemptive therapy of cytomegalovirus infection after allogeneic stem cell transplantation: Presented in part at the 39th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, San Francisco, CA, September 1999 (abstract H144). *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2002;99(4):1159-64.
78. Clercq ED, Holý A. Acyclic nucleoside phosphonates: a key class of antiviral drugs. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2005;4(11):928-40.
79. Lischka P, Hewlett G, Wunberg T, Baumeister J, Paulsen D, Goldner T, et al. In vitro and in vivo activities of the novel anticytomegalovirus compound AIC246. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2010;54(3):1290-7.
80. Melendez DP, Razonable RR. Letermovir and inhibitors of the terminase complex: a promising new class of investigational antiviral drugs against human cytomegalovirus. *Infection and Drug Resistance*. 2015:269-77.
81. Kropf D, von Richter O, Stobernack HP, Rübsamen-Schaeff H, Zimmermann H. Pharmacokinetics and safety of letermovir coadministered with cyclosporine A or tacrolimus in healthy subjects. *Clinical pharmacology in drug development*. 2018;7(1):9-21.
82. Foolad F, Aitken SL, Chemaly RF. Letermovir for the prevention of cytomegalovirus infection in adult cytomegalovirus-seropositive hematopoietic stem cell transplant recipients. *Expert Review of Clinical Pharmacology*. 2018;11(10):931-41.
83. MRK) MN. U.S. FDA Approves New Indication for Merck's PREVYMIS® (letermovir) for Prevention of Cytomegalovirus (CMV) Disease in High-Risk Adult Kidney Transplant Recipients 2023 [Available from: <https://www.merck.com/news/u-s-fda-approves-new-indication-for-mercks-prevymis-letermovir-for-prevention-of-cytomegalovirus-cmv-disease-in-high-risk-adult-kidney-transplant-recipients/>].

84. Goldner T, Hewlett G, Ettischer N, Ruebsamen-Schaeff H, Zimmermann H, Lischka P. The novel anticytomegalovirus compound AIC246 (Letermovir) inhibits human cytomegalovirus replication through a specific antiviral mechanism that involves the viral terminase. *Journal of virology*. 2011;85(20):10884-93.
85. Lischka P, Zhang D, Holder D, Zimmermann H. Impact of glycoprotein B genotype and naturally occurring ORF UL56 polymorphisms upon susceptibility of clinical human cytomegalovirus isolates to letermovir. *Antiviral Research*. 2016;132:204-9.
86. Chou S. A third component of the human cytomegalovirus terminase complex is involved in letermovir resistance. *Antiviral research*. 2017;148:1-4.
87. Chou S. Comparison of cytomegalovirus terminase gene mutations selected after exposure to three distinct inhibitor compounds. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2017;61(11):e01325-17.
88. Krishna B, Wills M, Sinclair J. Advances in the treatment of cytomegalovirus. *British Medical Bulletin*. 2019;131(1):5.
89. Drew WL, Miner RC, Marousek GI, Chou S. Maribavir sensitivity of cytomegalovirus isolates resistant to ganciclovir, cidofovir or foscarnet. *Journal of clinical virology*. 2006;37(2):124-7.
90. Chou S, Van Wechel LC, Marousek GI. Cytomegalovirus UL97 kinase mutations that confer maribavir resistance. *The Journal of infectious diseases*. 2007;196(1):91-4.
91. Chen S-J, Wang S-C, Chen Y-C. Antiviral agents as therapeutic strategies against cytomegalovirus infections. *Viruses*. 2019;12(1):21.
92. Chou S, Marousek GI. Maribavir antagonizes the antiviral action of ganciclovir on human cytomegalovirus. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2006;50(10):3470-2.
93. Administration FaD. FDA Approves First Treatment for Common Type of Post-Transplant Infection that is Resistant to Other Drugs  
Approval is for Cytomegalovirus, a Type of Herpes Virus 2021 [cited 2023 June, 24].
94. Winston DJ, Young J-AH, Pullarkat V, Papanicolaou GA, Vij R, Vance E, et al. Maribavir prophylaxis for prevention of cytomegalovirus infection in allogeneic stem cell transplant recipients: a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-ranging study. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2008;111(11):5403-10.
95. Chemaly RF, Chou S, Einsele H, Griffiths P, Avery R, Razonable RR, et al. Definitions of resistant and refractory cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients for use in clinical trials. *Clinical Infectious Diseases*. 2019;68(8):1420-6.
96. Gilbert C, Boivin G. New reporter cell line to evaluate the sequential emergence of multiple human cytomegalovirus mutations during in vitro drug exposure. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2005;49(12):4860-6.



97. Schnepf N, Boiteau N, Petit F, Alain S, Sanson-Le Pors M-J, Mazon M-C. Rapid determination of antiviral drug susceptibility of human cytomegalovirus by real-time PCR. *Antiviral research*. 2009;81(1):64-7.
98. Chou S, Van Wechel LC, Lichy HM, Marousek GI. Phenotyping of cytomegalovirus drug resistance mutations by using recombinant viruses incorporating a reporter gene. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2005;49(7):2710-5.
99. Drew WL. Ganciclovir resistance: a matter of time and titre. *The Lancet*. 2000;356(9230):609-10.
100. Chou S, Waldemer RH, Senters AE, Michels KS, Kemble GW, Miner RC, et al. Cytomegalovirus UL97 phosphotransferase mutations that affect susceptibility to ganciclovir. *The Journal of infectious diseases*. 2002;185(2):162-9.
101. Kotton CN, Kumar D, Caliendo AM, Åsberg A, Chou S, Danziger-Isakov L, et al. Updated international consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid-organ transplantation. *Transplantation*. 2013;96(4):333-60.
102. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the national academy of sciences*. 1977;74(12):5463-7.
103. Analysis MaTfG. Sanger Sequencing: Historical Development of Automated DNA Sequencing 2012 [updated August 1, 2012; cited 2023 June 26]. Available from: <https://agetsequencing.wordpress.com/2012/08/01/sanger-sequencing-historical-development-of-automated-dna-sequencing/>.
104. Göhring K, Mikeler E, Jahn G, Hamprecht K. Rapid semiquantitative real-time PCR approach for the detection of HCMV UL97 mutations conferring GCV resistance. *Antivir Ther*. 2008;13(3):461-6.
105. Chevillotte M, von Einem J, Meier BM, Lin F-M, Kestler HA, Mertens T. A new tool linking human cytomegalovirus drug resistance mutations to resistance phenotypes. *Antiviral research*. 2010;85(2):318-27.
106. Ducancelle A, Champier G, Alain S, Petit F, Le Pors M-JS, Mazon M-C. A novel mutation in the UL54 gene of human cytomegalovirus isolates that confers resistance to foscarnet. SAGE Publications Sage UK: London, England; 2006.
107. Lurain NS, Thompson KD, Holmes EW, Read GS. Point mutations in the DNA polymerase gene of human cytomegalovirus that result in resistance to antiviral agents. *Journal of virology*. 1992;66(12):7146-52.
108. Lurain NS, Weinberg A, Crumpacker CS, Chou S. Sequencing of cytomegalovirus UL97 gene for genotypic antiviral resistance testing. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2001;45(10):2775-80.
109. Chou S, Lurain NS, Thompson KD, Miner RC, Drew WL. Viral DNA polymerase mutations associated with drug resistance in human cytomegalovirus. *The Journal of infectious diseases*. 2003;188(1):32-9.
110. Chou S. Recombinant phenotyping of cytomegalovirus UL97 kinase sequence variants for ganciclovir resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2010;54(6):2371-8.

111. Boivin G, Goyette N, Rollag H, Jardine AG, Pescovitz MD, Asberg A, et al. Cytomegalovirus resistance in solid organ transplant recipients treated with intravenous ganciclovir or oral valganciclovir. *Antiviral therapy*. 2009;14(5):697-704.
112. Martin M, Azzi A, Lin S-X, Boivin G. Opposite effect of two cytomegalovirus DNA polymerase mutations on replicative capacity and polymerase activity. *Antiviral therapy*. 2010;15(4):579-86.
113. Tamura S, Osawa S, Ishida N, Miyazu T, Tani S, Yamade M, et al. Prevalence of UL97 gene mutations and polymorphisms in cytomegalovirus infection in the colon associated with or without ulcerative colitis. *Scientific Reports*. 2021;11(1):13676.
114. Castor J, Cook L, Corey L, Jerome KR. Rapid detection directly from patient serum samples of human cytomegalovirus UL97 mutations conferring ganciclovir resistance. *Journal of clinical microbiology*. 2007;45(8):2681-3.
115. Tamura K, Stecher G, Kumar S. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular biology and evolution*. 2021;38(7):3022-7.
116. Benson DA, Cavanaugh M, Clark K, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, et al. GenBank. *Nucleic acids research*. 2012;41(D1):D36-D42.
117. Okonechnikov K, Golosova O, Fursov M, Team U. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics*. 2012;28(8):1166-7.
118. Ulm U. MRA - mutation resistance analyzer Universität Ulm Helmholtzstr. 1689081 Ulm, Germany: Universität Ulm; 2013 [Available from: <https://dna.informatik.uni-ulm.de/software/mra/app/index.php?plugin=form>].
119. Marfori JE, Exner MM, Marousek GI, Chou S, Drew WL. Development of new cytomegalovirus UL97 and DNA polymerase mutations conferring drug resistance after valganciclovir therapy in allogeneic stem cell recipients. *Journal of clinical virology*. 2007;38(2):120-5.
120. Oshima K, Kanda Y, Kako S, Asano-Mori Y, Watanabe T, Motokura T, et al. Case report: persistent cytomegalovirus (CMV) infection after haploidentical hematopoietic stem cell transplantation using in vivo alemtuzumab: emergence of resistant CMV due to mutations in the UL97 and UL54 genes. *Journal of medical virology*. 2008;80(10):1769-75.
121. Torii Y, Horiba K, Kawada J-i, Haruta K, Yamaguchi M, Suzuki T, et al. Detection of antiviral drug resistance in patients with congenital cytomegalovirus infection using long-read sequencing: a retrospective observational study. *BMC Infectious Diseases*. 2022;22(1):1-9.
122. Aslani HR, Ziaie S, Salamzadeh J, Zaheri S, Samadian F, Mastoor-Tehrani S. Incidence of ganciclovir resistance in CMV-positive renal transplant recipients and its association with UL97 gene mutations. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR*. 2017;16(2):805.
123. Smibert OC, Catalano OA, Goodarzi K, Roberts MB. Case 23-2021: A 41-Year-Old Woman with Bloody Stools and Thrombocytopenia. *New England Journal of Medicine*. 2021;385(5):451-60.

124. Jabs DA. Cytomegalovirus retinitis and the acquired immunodeficiency syndrome—bench to bedside: LXVII Edward Jackson Memorial Lecture. *American journal of ophthalmology*. 2011;151(2):198-216. e1.
125. Grundy J, Shanley J, Griffiths P. Is cytomegalovirus interstitial pneumonitis in transplant recipients an immunopathological condition? *The Lancet*. 1987;330(8566):996-9.
126. Sassine J, Khawaja F, Shigle TL, Handy V, Foolad F, Aitken SL, et al. Refractory and resistant cytomegalovirus after hematopoietic cell transplant in the letermovir primary prophylaxis era. *Clinical Infectious Diseases*. 2021;73(8):1346-54.
127. Waller EC, Day E, Sissons JP, Wills MR. Dynamics of T cell memory in human cytomegalovirus infection. *Medical microbiology and immunology*. 2008;197:83-96.
128. Liu J, Kong J, Chang Y, Chen H, Chen Y, Han W, et al. Patients with refractory cytomegalovirus (CMV) infection following allogeneic haematopoietic stem cell transplantation are at high risk for CMV disease and non-relapse mortality. *Clinical Microbiology and Infection*. 2015;21(12):1121. e9-. e15.
129. Thoden J, Potthoff A, Bogner J, Brockmeyer NH, Esser S, Grabmeier-Pfistershammer K, et al. Therapy and prophylaxis of opportunistic infections in HIV-infected patients: a guideline by the German and Austrian AIDS societies (DAIG/ÖAG)(AWMF 055/066). *Infection*. 2013;41:91-115.
130. Luck SE, Wieringa JW, Blázquez-Gamero D, Henneke P, Schuster K, Butler K, et al. Congenital cytomegalovirus: a European expert consensus statement on diagnosis and management. *The Pediatric infectious disease journal*. 2017;36(12):1205-13.
131. Xie L, Liang X-N, Deng Y, Wang J, He Y, Li T-J, et al. Effects of storage time on cytomegalovirus DNA stability in plasma determined by quantitative real-time PCR. *Journal of virological methods*. 2014;207:196-9.
132. Roberts TC, Buller RS, Gaudreault-Keener M, Sternhell KE, Garlock K, Singer GG, et al. Effects of storage temperature and time on qualitative and quantitative detection of cytomegalovirus in blood specimens by shell vial culture and PCR. *Journal of clinical microbiology*. 1997;35(9):2224-8.
133. Fahle GA, Fischer SH. Comparison of six commercial DNA extraction kits for recovery of cytomegalovirus DNA from spiked human specimens. *Journal of clinical microbiology*. 2000;38(10):3860-3.
134. Tsai H-P, Tsai Y-Y, Lin I-T, Kuo P-H, Chen T-Y, Chang K-C, et al. Comparison of two commercial automated nucleic acid extraction and integrated quantitation real-time PCR platforms for the detection of cytomegalovirus in plasma. *PLoS One*. 2016;11(8):e0160493.
135. Sabatier M, Bal A, Destras G, Regue H, Quéromès G, Cheynet V, et al. Comparison of nucleic acid extraction methods for a viral metagenomics analysis of respiratory viruses. *Microorganisms*. 2020;8(10):1539.
136. Lorenz TC. Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*. 2012(63):e3998.

137. Delice S, Gökahmetoğlu S, Kaynar L, Karakükcü M. Gansiklovir tedavisi alan immün yetmezlikli hastalarda, CMV UL54 ve UL97 gen bölgelerinde gansiklovir direncinin araştırılması. *Mikrobiyol Bul.* 2015;49(3):393-402.
138. Smith IL, Cherrington JM, Jiles RE, Fuller MD, Freeman WR, Spector SA. High-level resistance of cytomegalovirus to ganciclovir is associated with alterations in both the UL97 and DNA polymerase genes. *Journal of Infectious Diseases.* 1997;176(1):69-77.
139. Kotton CN, Kumar D, Caliendo AM, Åsberg A, Chou S, Snyderman DR, et al. International consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid organ transplantation. *Transplantation.* 2010;89(7):779-95.
140. Chou S, Ercolani RJ, Vanarsdall AL. Differentiated levels of ganciclovir resistance conferred by mutations at codons 591 to 603 of the cytomegalovirus UL97 kinase gene. *Journal of Clinical Microbiology.* 2017;55(7):2098-104.
141. Drouot E, Piret J, Lebel MH, Boivin G. Characterization of multiple cytomegalovirus drug resistance mutations detected in a hematopoietic stem cell transplant recipient by recombinant phenotyping. *Journal of clinical microbiology.* 2014;52(11):4043-6.
142. Quinnan Jr GV, Kirmani N, Rook AH, Manischewitz JF, Jackson L, Moreschi G, et al. Cytotoxic T cells in cytomegalovirus infection: HLA-restricted T-lymphocyte and non-T-lymphocyte cytotoxic responses correlate with recovery from cytomegalovirus infection in bone-marrow-transplant recipients. *New England Journal of Medicine.* 1982;307(1):7-13.
143. Reusser P, Riddell SR, Meyers JD, Greenberg PD. Cytotoxic T-lymphocyte response to cytomegalovirus after human allogeneic bone marrow transplantation: pattern of recovery and correlation with cytomegalovirus infection and disease. 1991.
144. Einsele H, Roosnek E, Rufer N, Sinzger C, Riegler S, Löffler Jr, et al. Infusion of cytomegalovirus (CMV)-specific T cells for the treatment of CMV infection not responding to antiviral chemotherapy. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology.* 2002;99(11):3916-22.

## 8. EKLER

### **EK-1: Çocuk Hasta Onam Formu**

#### **ARAŞTIRMA AMAÇLI ÇALIŞMA İÇİN AYDINLATILMIŞ ONAM FORMU- ÇOCUK HASTA**

##### **(Hekimin Açıklaması) (Hasta Katılımcı/Hasta Ebeveyni için)**

“Primer ve Sekonder İmmün Yetmezlikli Hastalardan İzole Edilen Sitomegalovirüs Suşlarında Gansiklovir Direncinin Genotipik Yöntemlerle Araştırılması” başlıklı bir çalışma planlamaktayız. Sizi/çocuğunuzu çalışma kriterlerine uygun olduğunuz için çalışmamıza dahil etmek istiyoruz. İmmün yetmezlikli hastalarda, bu virüse bağlı hastalıklar yaygın olarak görülmekte ve bu durum geri dönüşümsüz sağlık sorunlarına hatta ölümlere sebep olabilmektedir. Bu virüse karşı uygulanan tedaviler çoğu zaman başarı ile sonuçlansa da bazen, uygun tedaviye rağmen, istenilen yanıt alınmamaktadır. Bu yanıtsızlık hali hastaya bağlı faktörlerle oluşabileceği gibi virüsün kazandığı direnç ile de olabilir. Bu ayrımın yapılmasında maalesef ülkemizde yeterli sayıda çalışma bulunmamaktadır. Yapacağımız bu çalışmayla virüsün geliştirdiği direnç mekanizmalarını, oranlarını, direnci etkileyen faktörleri, diğer ülkelere göre bizim ülkemizdeki durumu belirleyip gelecekte sizinle benzer durumda olan hastaların tedavisi için elimizdeki bilgileri diğer hekim arkadaşlarımızla birlikte kullanmayı amaçlıyoruz. Bu nedenle biz çocuklarda kan örneklerinde bazı testler yapmayı istiyoruz. Bu testler için sizden ek bir kan alınmayacak olup sadece merkez laboratuvara gelen kanların artan kısımları ile çalışmamızı devam ettireceğiz. Bu çalışmadan sorumlu öğretim üyesi Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı’ndan Prof. Dr. Ahmet Pınar’dır.

Sizin/çocuğunuzun bu araştırmaya katılmanızı/katılmasını öneriyoruz. Ancak hemen söyleyelim ki bu araştırmaya katılıp katılmamakta serbestsiniz. Çalışmaya katılım

gönüllülük esasına dayalıdır. Kararınızdan önce araştırma hakkında sizi bilgilendirmek istiyoruz. Bu bilgileri okuyup anladıktan sonra araştırmaya katılmak isterseniz formu imzalayınız. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı tarafından gerçekleştirilecek bu çalışmaya katılımınız araştırmanın başarısı için önemlidir.

Eğer araştırmaya katılmayı kabul ederseniz bu çalışmanın yardımcı araştırmacılarından Dr. Yasemin Özsürekcı veya onun görevlendireceği bir hekim tarafından muayene edileceksiniz ve bilgileriniz kaydedilecektir. Muayene sonucunda doktorunuz uygun görürse bu çalışmaya alınacaksınız. İsterseniz çalışmanın yardımcı araştırmacısı olan Doç. Dr. Yasemin Özsürekcı ile bizzat veya telefon ile görüşebilirsiniz (Yasemin Özsürekcı iş tlf: 03123051166, Cep tlf: 0533 2781312). İzniniz doğrultusunda sizden/çocuğunuzdan zaten yapılması planlanan kan tetkikleriniz alınırken aynı tüpün içerisine 2-3 cc daha kan alınacak ve santrifüj (hızlı çevirip kandan serum elde etmek için yapılır) edilerek merkez moleküler mikrobiyoloji laboratuvarında çalışılacak ve sonuçlara göre çalışmamıza dahil edilecektir. Elde edeceğimiz bilgilerin ülkemizdeki ve dünyadaki sizin gibi hastalığı bulunan diğer hastalara da faydası olacağına inanıyoruz.

***Kan alınması sırasında oluşabilecek riskler:*** Kan alınırken sizin/çocuğunuzun damarınızın/damarının dışına kan sızabilir ve morluk oluşabilir.

Bu çalışmaya katılmanız için sizden herhangi bir ücret istenmeyecektir. Çalışmaya katıldığımız için size ek bir ödeme de yapılmayacaktır. Sizinle ilgili tıbbi bilgiler gizli tutulacak, ancak çalışmanın kalitesini denetleyen görevliler, etik kurullar ya da resmi makamlarca gereği halinde incelenebilecektir. Bu çalışmaya katılmayı reddedebilirsiniz. Bu araştırmaya katılmak tamamen isteğe bağlıdır ve reddettiğiniz takdirde size uygulanan tedavide herhangi bir değişiklik olmayacaktır. Yine çalışmanın herhangi bir aşamasında onayınızı çekmek hakkına da sahipsiniz.

***(Katılımcının/Hastanın Beyanı)***

Sayın Prof. Dr. Ahmet Pınar yürütücülüğünde yapılacak bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya “katılımcı” olarak davet edildim/çocuğum davet edildi.

Eğer bu araştırmaya katılırsam/çocuğum katılırsa hekim ile aramda kalması gereken bana/çocuğuma ait bilgilerin gizliliğine bu araştırma sırasında da büyük özen ve saygı ile yaklaşılacağına inanıyorum. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgilerimin/çocuğumun bilgilerinin ihtimamla korunacağı konusunda bana yeterli güven verildi.

Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilebilirim. *(Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemim uygun olacağına bilincindeyim)*. Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı tutulabilirim.

Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır.

İster doğrudan ister dolaylı olsun araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorunumun/çocuğumun sağlık sorunun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. (Bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğim).

Araştırma sırasında bir sağlık sorunu ile karşılaştığımda; herhangi bir saatte, Dr. Aytekin Fırtına'ya cep: 0544 306 23 25 numaralı telefon üzerinden ulaşabileceğimi biliyorum.

Bu araştırmaya katılmak zorunda değilim ve katılmayabilirim. Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakımına ve hekim ile olan ilişkiye herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum.

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Kendi başıma belli bir düşünme süresi sonunda adı geçen bu araştırma projesinde “katılımcı” olarak

yer alma kararını aldım. Bu konuda yapılan daveti büyük bir memnuniyet ve gönüllülük içerisinde kabul ediyorum. İmzalı bu form kağıdının bir kopyası bana verilecektir.

**Katılımcı**

Adı, soyadı:

Adres:

Tel:

İmza

**Görüşme tanığı**

Adı, soyadı:

Adres:

Tel:

İmza

**Katılımcı ile görüşen hekim**

Adı soyadı, unvanı:

Adres:

Tel:

İmza:



## ARAŞTIRMA AMAÇLI ÇALIŞMA İÇİN ÇOCUK RIZA FORMU

Sevgili Kardeşim,

Sorumlu yürütücüsü Prof. Dr. Ahmet Pınar olan “Primer ve Sekonder İmmün Yetmezlikli Hastalardan İzole Edilen Sitomegalovirüs Suşlarında Gansiklovir Direncinin Genotipik Yöntemlerle Araştırılması” isimli araştırmanın yardımcı araştırmacısı olan ben Doç. Dr. Yasemin Özsürekci’yim. Araştırma konumuz olan sitomegalovirus senin gibi immün (mikroplara karşı yanıt) yetmezliği olan çocuk hastalarda ağır hastalıklara neden oluyor. Biz bu virüsün tedavisinde bazen istediğimiz cevabı alamıyoruz. Bu yanıtızlığın nereden kaynaklandığı anlamak için bu çalışmayı yapmayı istiyoruz. Bu çalışmadan çıkacak sonuçların diğer hastalara da yardımcı olacağına inanıyoruz. Bu araştırmaya katılmanı öneriyoruz.

Araştırmayı Prof. Dr. Ahmet Pınar yürütücüsü ve yardımcı araştırmacı olarak ben Dr. Yasemin Özsürekci bu çalışmayı birlikte yapacağız. Bu araştırmaya katılacak olursan senden zaten yapmamız gereken bazı kan tetkiklerinin yanında ekstra 2-3 cc daha kan tetkiki alacağız ya da alınan tetkiklerinden arta kalan kanı kullanacağız. Kan alınırken canın biraz acıyabilir.

Bu araştırmanın sonuçları senin gibi immün yetmezliği olan çocuklarda sitomegalovirus enfeksiyonu tedavisi için yararlı bilgiler sağlayacaktır. Bu araştırmanın sonuçlarını başka doktorlara da söyleyeceğiz, sonuçları bildireceğiz ama senin adını ve diğer kimlik bilgilerini söylemeyeceğiz.

Bu araştırmaya katılıp katılmamak için karar vermeden önce anne ve baban ile konuşup onlara danışmalısın. Onlara da bu araştırmadan bahsedip onaylarını/izinlerini

alacağız. Anne ve baban tamam deseler bile sen kabul etmeyebilirsin. Bu araştırmaya katılmak senin isteğine bağlı ve istemezsen katılmazsın. Bu nedenle hiç kimse sana kızmaz ya da ksmez. nce katılmayı kabul etsen bile sonradan vazgeebilirsiniz, bu tamamen sana bağlı. Kabul etmediğin durumda da doktorlar muayene ve diğer işlemlerde sana önceden olduğu gibi iyi davranır, önceye göre farklılık olmaz.

Aklına şimdi gelen veya daha sonra gelecek olan soruları istediğin zaman bana sorabilirsin. Telefon numaram ve adresim bu kâğıtta yazıyor. Bu araştırmaya katılmayı kabul ediyorsan aşağıya lütfen adını ve soyadını yaz ve imzanı at. İmzaladıktan sonra sana ve ailene bu formun bir kopyası verilecektir.

Çocuğun adı, soyadı:

Çocuğun imzası:

Tarih:

Velisinin adı, soyadı:

Velisinin imzası:

Tarih:

Araştırıcının adı, soyadı, nvani:

Adres:

Tel:

İmza:

## **EK-2: Erişkin Hasta Onam Formu**

### **ERİŞKİN HASTA ONAM FORMU**

#### **Hekimin Açıklaması**

‘Primer ve Sekonder İmmün Yetmezlikli Hastalardan İzole Edilen Sitomegalovirüs Suşlarında Gansiklovir Direncinin Genotipik Yöntemlerle Araştırılması’ isimli çalışma Prof. Dr. Ahmet Pınar sorumluluğunda yapılmaktadır. Araştırma immün (mikroplara karşı savunma yanıtı) yetmezliği olan hastalarda ciddi sonuçlar doğuran sitomegalovirüs enfeksiyonlarında karşılaşılan virüs direncini test etmeyi amaçlamaktadır. Araştırmaya katılmanız gönüllülük esasına dayalıdır. Bu form aracılığı ile elde edilecek bilgiler gizli kalacaktır ve sadece bilimsel amaçlar için kullanılacaktır. Sizin de bu araştırmaya katılmanızı öneriyoruz. Ancak bu araştırmaya katılıp katılmamakta serbestsiniz. Kararınızdan önce araştırma hakkında sizi bilgilendirmek istiyoruz. Bu bilgileri okuyup anladıktan sonra araştırmaya katılmak isterseniz formu imzalayınız.

Erişkin hastalarda primer ya da organ transplantasyonu, hematolojik maligniteler, HIV enfeksiyonları ve benzeri sebeplerden dolayı kazanılmış immün yetmezlik tabloları gelişebilmektedir. Sitomegalovirüs bu hastalarda ciddi hastalıklara ve ölümlere sebep olabilmektedir. Uygun tedavi ile başarılı sonuçlar alınsa da bazen tedaviden istenilen başarı elde edilememektedir. Biz bu çalışmamızda uygun tedaviye rağmen elde edilen başarısızlığın sebeplerinden biri olan virüse bağlı ilaç direncini araştırmayı amaçlıyoruz. Bu çalışma için sizden fazladan kan örneği alınmayacak olup tanı ve tedaviniz için laboratuvara gönderilen plazma örneğinizden arta kalan kısımdan çalışma yapılacaktır. Bu çalışmayı bir yıl içerisinde bitirmeyi hedeflemekteyiz.

Eğer araştırmaya katılmayı kabul ederseniz, Doç. Dr. Ahmet Çağkan İnkaya veya onun görevlendireceği bir araştırmacı tarafından bulgularınız kaydedilecektir. Bu kayıtlar kimliğiniz belirtilmeden tıp öğrencilerinin eğitiminde veya bilimsel nitelikte yayınlarda kullanılabilir. Bu amaçların dışında bu kayıtlar kullanılmayacak ve başkalarına verilmeyecektir. Muayene sırasında yapılan rutin testler yapılacaktır. Bu çalışma için size ek bir kan testi yapılmayacaktır. Yapılan testler herhangi bir hayati

risk taşımamaktadır. Bu çalışmaya katılmanız için sizden herhangi bir ücret istenmeyecektir. Çalışmaya katıldığınız için size ek bir ödeme de yapılmayacaktır.

Bu çalışmaya katılmayı reddedebilirsiniz. Bu araştırmaya katılmak tamamen isteğe bağlıdır ve reddettiğiniz takdirde size uygulanan tedavide herhangi bir değişiklik olmayacaktır. Yine çalışmanın herhangi bir aşamasında onayınızı çekmek hakkına da sahipsiniz.

Sizinle ilgili tıbbi bilgiler gizli tutulacak, ancak çalışmanın kalitesini denetleyen görevliler, etik kurullar ya da resmi makamlarca gereği halinde incelenebilecektir.

### **Katılımcının/Hastanın Beyanı**

Sayın Prof. Dr. Ahmet Pınar tarafından Hacettepe Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı ile tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya “katılımcı” olarak davet edildim. Eğer bu araştırmaya katılırsam hekim ile aramda kalması gereken bana ait bilgilerin gizliliğine bu araştırma sırasında da büyük özen ve saygı ile yaklaşılacağına inanıyorum. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgilerimin ihtimamla korunacağı konusunda bana yeterli güven verildi. Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilebilirim. (Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemim uygun olacağına bilincindeyim) Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı tutulabilirim. Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır. İster doğrudan ister dolaylı olsun araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorununun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. (Bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğim).

Araştırma sırasında bir sağlık sorunu ile karşılaştığımda; herhangi bir saatte, Dr. Aytekin Fırtına’ya cep: 0544 306 23 25 numaralı telefonda 24 saat boyunca ulaşabileceğimi biliyorum.

Bu araştırmaya katılmak zorunda değilim ve katılmayabilirim. Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakımına ve hekim ile olan ilişkime herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum. Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Kendi başıma belli bir düşünme süresi sonunda adı geçen bu araştırma projesinde “katılımcı” olarak yer alma kararını aldım.

İmzalı bu form kağıdının bir kopyası bana verilecektir.

### **Katılımcı**

Adı, soyadı:

Adres:

Tel:

İmza:

### **Görüşme tanığı**

Adı, soyadı:

Adres:

Tel:

İmza:

### **Katılımcı ile görüşen hekim**

Adı soyadı, nvanı:

Adres:

Tel :

İmza :